N° d'enregistrement
au C.N.R.S.

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

par

Odile COLARD - TORQUEBIAU

pour obtenir

le grade de Docteur ès Sciences

Sujet de la Thèse :

PHOSPHOLIPASES DES MEMBRANES PLASMIQUES ISOLEES DU FOIE DE RAT

Soutenue le 28 MAI 1975 devant la Commission d'Examen

MM. J. POLONOVSKI, Président

P. MAZLIAK, Examinateur

M. PASCAUD

L. DOUSTE - BLAZY

Mlle N. BAUMANN

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

par

Odile COLARD - TORQUEBIAU

pour obtenir

le grade de Docteur ès Sciences

Sujet de la Thèse :

PHOSPHOLIPASES DES MEMBRANES PLASMIQUES ISOLEES DU FOIE DE RAT.

Soutenue le

devant la Commission d'Examen

MM. J. POLONOVSKI, Président
P. MAZLIAK, Examinateur
M. PASCAUD
L. DOUSTE-BLAZY
Mlle.N. BAUMANN

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Biochimie du CHU Saint-Antoine, Université PARIS VI.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur J. POLONOVSKI qui m'a accueillie dans son service et m'a prodigué ses conseils avec beaucoup de bienveillance.

C'est avec une profonde tristesse que j'évoque ici le souvenir de Madame PAYSANT qui m'a initiée à l'étude des phospholipases et a engagé mes recherches dans cette voie.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur MAZLIAK de l'intérêt qu'il a porté à ce travail et d'avoir accepté d'être le rapporteur de ce mémoire.

Je remercie également Monsieur le Professeur DOUSTE-BLAZY, Monsieur le Professeur PASCAUD et Mademoiselle BAUMANN qui ont bien voulu faire partie de mon jury et dont les remarques judicieuses m'ont aidé à clarifier certains points de cette étude.

Que tous ceux dont l'amitié et l'aide efficace m'ont permis de réaliser ce travail trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance.

P L A N

INTRODUCTION

MATERIEL ET METHODES

- Traitement des animaux
- Préparations membranaires
  - . Enzymes marqueurs
  - . Microscopie électronique
- Etude des activités phospholipasiques
  - . Préparation de substrats
  - . Techniques d'incubation et de dosage
  - . Activation des phospholipases.
- Etude des activités acyl transférasiques
  - . Technique d'incubation
  - . Préparation du complexe albumine-acide gras.

RESULTATS

I - Mise en évidence d'activités phospholipasiques :

- Tests de pureté des membranes
- Déacylation de phospholipides exogènes
- Déacylation des phospholipides endogènes

II - Spécificité des phospholipases membranaires :

- Vis-à-vis des substrats exogènes
  - . en fonction du type de glycérophospholipide
  - . en fonction de la position et de la nature de l'acide gras.
- Vis-à-vis des substrats endogènes
- Hydrolyse d'un substrat endogène en présence d'un substrat exogène.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542722_0046

III - Influence des conditions de préparation et rôle d'un facteur plaquettaire :

- Injection d'héparine et lavage des foies
- Activation de la phospholipase A_2 par un facteur plaquettaire

IV - Liaisons des phospholipases à la membrane :

- Action de la force ionique
- Action de la papaïne
- Relation entre phospholipase A_2 et récepteurs de l'insuline et du glucagon.

V - Incorporation d'acides gras dans les phospholipides membranaires.

DISCUSSION

RESUME

INTRODUCTION

Les membranes cellulaires sont des ensembles lipoprotéiques qui forment une frontière entre deux compartiments adjacents. Les interactions entre lipides et protéines au sein des membranes peuvent en affecter la configuration, la stabilité et l'activité physiologique. Des recherches sur les forces qui unissent lipides et protéines ont été faites sur des lipoprotéines du sérum (1) du jaune d'oeuf (2) et sur des membranes cellulaires spécifiques (3, 4) ; elles apportent un ensemble de preuves en faveur de liaisons polaires (ioniques, ponts hydrogènes), ainsi que d'interactions hydrophobes entre les chaînes d'acides gras des phospholipides et les régions apolaires des molécules de protéines (5) ; éventuellement aussi des liaisons entre certains résidus d'amino-acides et les doubles liaisons des acides gras polyéthyléniques des lipides peuvent intervenir.

Il est maintenant établi que la composition en acides gras des phospholipides est hautement spécifique et caractéristique non seulement du tissu d'origine (6, 7) mais des fractions subcellulaires (8). Cette spécificité prend une importance particulière au niveau des membranes où les études de film à l'équilibre d'acides gras et de phospholipides ont démontré que la longueur des chaînes des acides gras (9, 10, 11) ainsi que leur degré d'insaturation (10) sont des éléments importants de la cohésion moléculaire : plus la chaîne est courte et plus elle est insaturée, plus le film est lâche. On sait cependant que les films de phospholipides insaturés peuvent être rendus plus compacts par addition de cholestérol ou de triglycérides saturés (9, 10). On conçoit donc que, suivant la composition de la phase lipidique, il puisse exister différentes possibilités pour l'arrangement moléculaire incluant la structure

globulaire de BENSON et SJONSTRAND (12) aussi bien que la double couche lipidique de DANIELLI et DAWSON telle que l'a élaborée ROBERTSON (13). L'étude des différents modèles membranaires sous l'angle de la thermodynamique des systèmes macromoléculaires ont conduit SINGER et NICOLSON (14) à envisager un modèle en mosaïque dans lequel des protéines globulaires de structure ("integral proteins") et des protéines superficielles plus faiblement liées à la membrane ("peripheral proteins") alternent avec des sections d'une double couche phospholipidique. Ces protéines, de même que les phospholipides, s'organiseraient avec un pôle hydrophobe vers l'intérieur de la membrane et un pôle hydrophile tourné vers l'extérieur.

Le rôle des phospholipides ne se limite pas dans les membranes à la constitution de la double couche ; certains d'entre eux interviennent dans des associations plus étroites avec des protéines membranaires et sont même indispensables à leur activité biologique : c'est le cas bien connu des phospholipides liés au cytochrome C (15), celui aussi d'une espèce moléculaire de diphosphatidyl glycerol ne contenant que de l'acide linoléique liée à la cytochrome oxydase (16) des membranes mitochondriales internes ou de la phosphatidyl sérine qui réalise la liaison entre le récepteur au glucagon et l'adényl cyclase des membranes des cellules du coeur de chat (17).

Les modifications de la composition lipidique sont donc d'une importance capitale tant en ce qui concerne la structure membranaire que son rôle physiologique qui ne peut être que très lié aux processus dynamiques de ses constituants.

Des expériences récentes de marquage "in vivo" à l'acétate (^{14}C) et au glycérol (^{3}H) (18) montrent, sauf pour la sphingomyéline un renouvellement identique des phospholipides des membranes plasmiques et de ceux des microsomes. Il semble et ceci en accord avec les résultats d'études de renouvellement de différentes protéines membranaires (19, 20) qu'il existe une relation dynamique entre ces deux systèmes membranaires.

Pourtant membranes plasmiques et microsomes présentent de grandes différences dans leurs possibilités de biosynthèse : ainsi si les membranes plasmiques sont capables comme les mitochondries (21) de synthétiser du phosphatidyl glycerol à partir de CDP diglycéride et de glycero-3-phosphate, elles ne possèdent pas les enzymes nécessaires à la synthèse "de novo" de phospholipides contenant des groupements azotés tels que la phosphatidyl-choline (22). La synthèse de ces phospholipides a lieu sans doute exclusivement dans le reticulum endoplasmique (23). Ainsi pour leur approvisionnement en phospholipides, les membranes plasmiques semblent totalement dépendantes des microsomes. L'échange de molécules intactes de phospholipides entre membranes (24, 25) peut jouer un rôle important dans un tel processus ; on a d'ailleurs pu isoler différentes protéines qui au niveau du cerveau et du coeur de boeuf assureraient le transport des phospholipides intracellulaires (26). Des transacylations ultérieures pourraient expliquer la formation d'espèces moléculaires spécifiques.

De nombreux auteurs ont étudié la composition lipidique des membranes plasmiques de foie (27, 32) et constaté, en dehors d'un taux de cholestérol libre beaucoup plus élevé, de grandes similarités avec les différentes catégories de lipides de l'homogénat total. Cependant, R. WOOD a montré, par l'étude de la composition en acides gras de chaque catégorie de lipides des membranes plasmiques (33) et de l'homogénat total (6, 8) la présence d'une sélectivité au niveau de certaines espèces moléculaires de phospholipides : ainsi les membranes présentent une distribution différente des acides palmitique et stéarique qui estérifient en position 1 la phosphatidyl choline et la phosphatidyl ethanolamine et distribution différente aussi des acides gras en position 2 du phosphatidyl inositol.

Cette sélection par rapport aux chaînes d'acides gras peut s'établir à différents niveaux de la synthèse des phospholipides :

1. au niveau de l'introduction des chaînes d'acides gras sur la molécule de glycérol (34, 35).

2. par une utilisation sélective des espèces moléculaires de diglycérides et d'acides phosphatidiques ainsi créées au cours des réactions dépendant des nucléotides à cytidine (36, 37).

3. enfin à travers une redistribution des chaînes par un cycle de déacylation-reacylation faisant intervenir des phospholipases A et des acyl-transférases spécifiques.

PASCAUD (38) a montré en 1964 que la vitesse de renouvellement des acides gras dans les phospholipides des différentes fractions subcellulaires de foie était très rapide et variable selon l'acide gras. Il pense que le mécanisme d'acylation des lysodérivés observés par LANDS (39) doit jouer un rôle important. Puis, en 1966, VAN DEENEN comparant les vitesses de renouvellement des différents groupements des molécules de phospholipides du foie constatait que l'acide palmitique se renouvellait plus rapidement que le glycérol (40). Ces deux auteurs mettaient ainsi en évidence l'existence d'un cycle de déacylation-reacylation. Cette vitesse de renouvellement peut atteindre, dans des lymphocytes sensibilisés (41) et pour les acides gras à longue chaîne de la lécithine, 100 fois la vitesse de la synthèse "de novo".

La présence d'activités phospholipasiques intrinsèques dans la membrane a été prouvée lors de réactions cytolytiques diverses où les ruptures membranaires s'accompagnent de l'augmentation des produits d'hydrolyse des phospholipides : ainsi mise en évidence d'une activité phospholipasique lors de l'action anticorps-complément sur les globules rouges (42), lors de l'action des colicines sur une culture d'E. Coli (43) ou de la lyse de mastocytes par des lymphocytes sensibilisés (41).

De même la formation de prostaglandines à partir des acides gras de phospholipides que l'on sait être membranaires (44) ne peut se concevoir sans une activité phospholipasique intrinsèque.

La plupart des études de membranes plasmiques isolées ont été faites sur des membranes obtenues à partir de foies. C'est la technique de flottation introduite par NEVILLE (45) en 1960 qui a permis les premières séparations de membranes. Depuis des modifications ont été apportées à cette méthode, notamment la centrifugation en rotor zonal (46).

Dans le foie de rat, on a mis en évidence des phospholipases A agissant préférentiellement en position 2 dans les mitochondries (47, 48) et en position 1 dans les microsomes (49, 50) et des transacylases dans ces mêmes deux sous fractions (51, 53) catalysant la transformation des composés monoacylés en composés diacylés. La présence de ces enzymes rend possible l'existence dans les mitochondries et dans les microsomes d'un cycle de déacylation-reacylation.

Dans les membranes plasmiques, les premiers travaux concernant l'acylation datent de 1968 : STAHL et TRAMS (54) avaient montré que les membranes pouvaient incorporer des acyls Co-A à longue chaîne principalement dans les phospholipides puis PANDE et MEADS (55) décrivirent la présence dans une fraction riche en membranes de l'enzyme activant le palmitate ; STEIN et STEIN (56) ont montré que les membranes sont capables d'acyler une lysolécithine exogène qui devient alors un composant structural de la membrane. Mais ces résultats ont été mis en doute l'année suivante par LANDS et coll. (57) pour qui l'activité acyltransférasique des membranes est très faible comparée à celle des microsomes et par KAULEN (58) qui pense que cette activité est dûe à une contamination microsomiale des membranes plasmiques. En 1970, nous avons constaté (59) la présence d'une activité phospholipasique dans les membranes plasmiques.

Dans cette étude nous décrivons la présence dans les membranes plasmiques d'activités phospholipasiques A_1 et A_2 ainsi que de faibles activités acyltransférasiques. Nous montrerons d'abord que les membranes plasmiques sont capables d'hydrolyser les phospholipides en lysodérivés et que cette activité phospholipasique A peut s'exercer sur des substrats exogènes et sur les phospholipides endogènes. Par l'utilisation de substrats spécifiquement marqués, nous mettrons ensuite en évidence l'existence de deux phospholipases A_1 et A_2 dont les conditions d'activité et le mode de liaison à la membrane diffèrent en de nombreux points, ces différences pouvant s'interprêter par des localisations différentes des sites actifs de ces deux enzymes. L'étude de l'incorporation d'acides gras dans

les phospholipides membranaires ayant montré l'existence d'une faible activité acyltransférasique, nous discuterons du rapport possible de ces deux activités, phospholipasique et acyltransférasique, dans le cadre d'un éventuel cycle de déacylation-reacylation "in vivo". D'autres interprétations fonctionnelles pour ces activités phospholipasiques des membranes plasmiques seront aussi envisagées.

MATERIEL ET METHODES

PREPARATIONS MEMBRANAIRES

Traitement des animaux

Nous utilisons des rats mâles ou femelles pesant entre 150 et 250 g. dont la ration alimentaire contient 3 % de lipides essentiellement d'origine végétale donc à forte teneur en acides insaturés. Après anesthésie à l'éther, les foies sont prélevés soit après exsanguination des rats par ponction au niveau de la fourche aortique, soit après perfusion des foies par du sérum physiologique. Pour cette perfusion, après ligature de la veine porte juste au dessus de sa jonction avec la veine mésentérique supérieure, on pose un cathéter dans la veine porte avant sa bifurcation vers les différents lobes du foie. Cette perfusion se faisant sous une pression correspondant à environ 1 m. d'eau, le liquide de perfusion s'écoulant goutte à goutte, on observe la décoloration progressive du foie, les veines sus-hépatiques ne sont coupées que lorsque cette décoloration est devenue stable. Le foie étant prélevé, on vérifie que le liquide d'écoulement est incolore. L'injection d'héparine, s'il y a lieu, se fait dans la veine saphène ; elle est de 500 Unités par rat, soit 5 mg d'héparine.

Préparations proprement dites

Les membranes sont généralement préparées par la méthode de NEVILLE (45) modifiée par EMMELOT (60). Si l'on part de 40 g. de foie ce qui représente environ 6 rats, il faut 1 litre de milieu d'homogénisation ($NaHCO_3$ 1mM pH 7,4). Après une première centrifugation en deux étapes, à 200 g. pendant 1 minute puis à 2 000 g. pendant 10 minutes, il est possible de distinguer 2 couches dans le précipité : au fond une masse gélatineuse plus ou moins colorée selon que les foies ont été ou non perfusés ; ce sont les noyaux, des débris

cellulaires et des hématies. Les membranes forment une couronne blanchâtre au dessus et tout autour. Après mise en suspension délicate de ces membranes, les noyaux sont prélevés au moyen d'une spatule et éliminés. Suit une série de centrifugation à 1 100 g. jusqu'à ce que le surnageant soit limpide qui élimine une grande partie des mitochondries et des microsomes. Le précipité est alors suspendu dans du $NaHCO_3$ 1mM et mélangé à une solution de saccharose de d = 1,30 dans une proportion telle que l'on obtienne une densité vérifiée au réfractomètre de 1,22 (pour 10 ml de d = 1,30 il faut environ 3,6 ml de suspension membranaire). Trois autres couches de saccharose de densité 1,20 - 1,18 - 1,16 sont utilisées pour la flottation des membranes sur gradient discontinu. On centrifuge 90 minutes à 90 000 g avec un rotor SW 25 à godets mobiles. Les membranes flottent à l'interface 1,18 - 1,16 sous forme d'un feuillet compact très facile à prélever. Les autres fractions subcellulaires non éliminées précédemment se situent au fond du tube pour les noyaux et aux différentes interfaces : 1,22 - 1,20 pour les mitochondries et 1,18 - 1,20 pour les microsomes. Les membranes sont alors lavées par du $NaHCO_3$ 1mM de façon à éliminer le saccharose puis resuspendues dans du $NaHCO_3$ 1 mM de telle sorte que l'on ait à peu près 2 mg de protéines par ml. Elles sont soit utilisées aussitôt, soit congelées.

Cette méthode donne un rendement qui varie entre 3 et 5 mg de protéines pour 10 g. de foie lorsque les rats sont simplement exsanguinés. Cette même méthode utilisée après perfusion des foies donne un rendement pouvant être jusqu'à 10 fois plus faible, ce qui explique que certains auteurs (61, 62) aient pensé impossible de préparer des membranes par la méthode de NEVILLE avec des foies perfusés.

La faiblesse des rendements obtenus alors nous a conduit à utiliser dans certains cas la méthode de RAY (63). Elle diffère de la précédente par la présence dans le milieu d'homogénisation de $CaCl_2$ 0,5 mM en plus du $NaHCO_3$ 1 mM et par une dilution de l'homogénat

4 fois plus importante (1 litre de milieu d'homogénisation pour 10 g. de foie). Les noyaux ne sont éliminés qu'au cours du gradient discontinu qui est en tout point semblable au précédent.

Le rendement en protéines membranaires est alors bien supérieur (10 mg pour 10g) mais nous n'avons pu obtenir de résultats constants en ce qui concerne les tests enzymatiques et la contamination microsomiale est un peu supérieure.

Dans certains cas, pour obtenir une meilleure purification, nous avons centrifugé en gradient continu de saccharose (de 30 % à 60 %) les suspensions membranaires obtenues après un gradient discontinu. Les membranes sont alors déposées à la surface du gradient et centrifugées 5 heures à 100 000 g. Les membranes sont retrouvées dans la zone de saccharose de densité 1,16.

Dosage des protéines et du phosphore

Les suspensions des membranes homogénéisées au potter sont toujours redispersées au moment de leur utilisation par agitation sur un agitateur Vortex.

Les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY (64).

Le phosphore des phospholipides membranaires est dosé après minéralisation à l'acide sulfurique selon la méthode de FISKE modifiée par DELSAL (65, 69).

Dosages enzymatiques

Le degré de pureté des préparations membranaires est évalué au moyen de tests enzymatiques et par examen au microscope électronique.

Comme enzymes de référence des différentes fractions subcellulaires, nous avons choisi :

- le glucose 6 phosphatase pour les microsomes (66)
- la cytochrome oxydase pour les mitochondries (67)
- la 5'mononucléotidase (68) comme enzyme spécifique des membranes.

METHODE NEVILLE-EMMELOT

Homogénat
de $NaHCO_3$ 1 mM
1000 cc pour 40 g. de foie

1 mn à 200 g
10 mn à 2000 g

surnageant

Précipité

1 mn à 200 g
1100 g 10 mn

surnageant

noyaux
éliminés

entre 3 et 5 fois

Précipité

10 mn à
1100 g

surnageant

Précipité + $NaHCO_3$ 1mM
+ saccharose d = 1,30

METHODE RAY

Homogénat
de $NaHCO_3$ 1 mM + Ca^{++} 0,5 mM
1000 cc pour 10 g. de foie

15 mn à 1000 g

surnageant

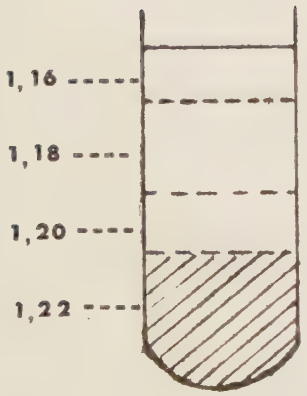
Précipité

2 ou 3 fois

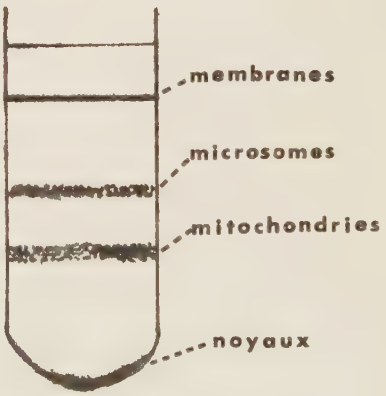
15 mn à 1000 g

surnageant

Précipité + $NaHCO_3$ 1mM
+ saccharose d = 1,30



90 min. ou 120 min.
à 90 000 g
dans rotor à godets mobiles



PREPARATIONS MEMBRANAIRES

La cytochrome oxydase est dosée dans un tampon phosphate à pH 7,4 par la diminution de densité optique à 550 mμ résultant de l'oxydation du cytochrome C réduit. Le blanc de lecture contenant du ferricyanure de potassium, la densité optique est lue de 3 minutes en 3 minutes.

La glucose 6 phosphatase est dosée dans un tampon acétate 0,1M à pH 6,5 à 37°. On dose le phosphate libéré par la méthode de FISKE et SUBBAROW (69) à froid, le glucose 6 phosphate s'hydrolysant spontanément à la chaleur.

La 5'mononucléotidase est dosée à pH 7,5 dans un tampon véronal en présence de SO_4Mn ou dans un tampon tris en présence de $MgCl_2$ avec 5'AMP sous forme de sel de sodium comme substrat. Le milieu contient 2 μmoles de 5'AMP et 30 à 50 μg de protéines membranaires. Après 10 minutes d'incubation, la réaction est arrêtée par 2 ml d'acide trichloracétique à 10 %. On dose le phosphate libéré.

Microscopie électronique

Pour l'examen au microscope électronique, les membranes aussitôt récupérées sur le gradient de saccharose et lavées au $NaHCO_3$ 1 mM sont fixées pendant 60 minutes avec du glutaraldéhyde dans un tampon Millonig (pH 7,2), rincées avec le même tampon et post fixées pendant 30 minutes dans une solution de Os O_4 dans du tampon Millonig. Après deshydratation à l'alcool, les coupes sont mises en capsule dans l'Epon et examinées sur un microscope Siemens. Les micrographies présentées dans ce travail ont été effectuées par Mlle ANTEUNIS dans le service du professeur ROBINEAU (INSERM).

Mesures d'activité phospholipasique sur des substrats exogènes

L'activité phospholipasique A globale est mesurée par la quantité de lysophospholipides formée à partir de phospholipides exogènes marqués soit au ^{32}P, soit au ^{14}C sur l'ensemble de la molécule.

Les activités A_1 et A_2 sont mesurées par les quantités d'acides gras et de lysophospholipides formées à partir d'un phospholipide exogène spécifiquement marqué sur l'acide gras en position 2.: L'activité A_1 par le taux de radioactivité retrouvé dans les

lysodérivés, l'activité A_2 par le taux de radioactivité retrouvé dans les acides gras.

PREPARATION DE SUBSTRATS

- Substrats non spécifiques :
  - . {^{32}P} Phosphatidyl glycerol -(PG)
  - . {^{32}P} Phosphatidyl ethanolamine -(PE)
  - . {^{14}C} Phosphatidyl ethanolamine -(PE)
- Substrats spécifiques :
  - . Phosphatidyl ethanolamine 2 - linoléique 1^{14}C (*)
  - . Phosphatidyl 2 - arachidonique 1 ^{14}C (**)

Phosphatidyl glycerol -(PG)

Le PG est extrait de Staphylococcus aureus cultivé sur gélose contenant du phosphate radioactif. Les staphylocoques sont ensemencés dans un bouillon nutritif et incubés pendant une nuit à 37°. Cette suspension est répartie à raison de 0,5 ml par boîte de Petri contenant chacune 1,5 mCi de phosphate radioactif. L'incubation est effectuée à 37° pendant 6 heures. La culture microbienne est mise en suspension par grattage de la gélose en présence de tampon Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 0,2 M à pH 7. Après centrifugation, le culot, débarrassé du phosphate radioactif non incorporé, est extrait au chloroforme méthanol 1/2 (v/v). Après purification de l'extrait lipidique selon la technique de FOLCH (70) le PG est isolé après passage sur colonne d'acide silicique par le mélange chloroforme méthanol 4/1 (v/v). Sa pureté est contrôlée par chromatographie sur couche mince et autoradiographie. L'activité spécifique du PG obtenu varie entre 150 000 et 200 000 cpm/min/µg de phosphore, soit entre 2,2 et 3,2 mCi/mmole.

Phosphatidyl ethanolamine (PE)

{^{32}P} PE et {^{14}C} PE sont préparés à partir d'une souche d'E. Coli K_{12} 3000 ensemencée en milieu tryptose Ts. Dans le cas de la PE

(*) (C'est à dire le sn 1 acyl 2 linoleyl ^{14}C glycero phosphoryl-éthanolamine)

(**) (C'est à dire le sn 1 acyl 2 arachidonyl ^{14}C glycérophosphoryl-éthanolamine).

marquée au ^{32}P, 10 ml de milieu renferment 2 mCi de phosphate ^{32}P. Pour la PE marquée au ^{14}C, on utilise 1 mCi d'acétate ^{14}C pour 25 ml de milieu. Les bactéries sont recueillies après 4 heures 30 à 37° par centrifugation et lavées par du tampon Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 0,2 M à pH 7. L'extrait lipidique au chloroforme méthanol 1/2 est purifié par la technique de FOLCH-PI (70) puis déposé sur colonne d'acide silicique. La PE est éluée par le mélange chloroforme méthanol 7/1 (v/v).

L'activité spécifique de Pa {^{32}P} PE est en moyenne de 500 000 cpm/min/µg de phosphore, soit 7,2 mCi / mmole.

Pour les incubations, elle est diluée avec de la PE non radioactive de façon à avoir une activité spécifique de 1,5 mCi / mmole.

Celle de la {^{14}C} PE est de 150 000 à 200 000 cpm/min/µg de phosphore, soit 2,9 mCi / mmole. Elle est utilisée telle quelle.

Phosphatidyl éthanolamine-2-^{14}C linoléique ou 2 ^{14}C arachidonique.

Ce substrat est préparé par reacylation enzymatique (71) de sn-1-acyl-3-phosphoryl éthanolamine par de l'acide linoléique-1-^{14}C (58 mCi/mmole) ou de l'acide arachidonique (50 mCi/mmole) au moyen de microsomes.

La 1-acyl lysophosphatidyl éthanolamine provient de l'hydrolyse par du venin de Crotalus Adamenteus de phosphatidyl éthanolamine isolée d'E. Coli (72, 73).

Après passage sur colonne d'acide silicique, 25 µmoles de 1-acyl lyso PE sont ultrasonnées dans un tampon KH_2PO_4 0,2 M pH 7,4 contenant 125 µCi d'acide linoléique. A ce mélange on ajoute 100 µmoles d'ATP Na_2, 2 µmoles de Co-enzyme A, 100 µmoles de $MgCl_2$ et 1 ml de microsomes contenant 30 mg de protéines. Le volume final est de 5 ml. Le mélange total est de nouveau ultrasonné quelques secondes

avant d'être incubé 1 heure à 37°. Les lipides sont extraits au chloroforme méthanol 1/2 et la PE formée est purifiée par chromatographie sur couche mince préparative dans le système chloroforme-méthanol-eau 65/25/4. Elle est éluée par mise en suspension du gel de silice dans des mélanges de chloroforme et de méthanol 7/1 (v/v) puis 4/1 (v/v).

L'activité spécifique est en moyenne de $2,5\ 10^5$ dpm/µg de phosphore, soit 3,6 mCi/mmole pour la PE 2 linoléique-1 ^{14}C. Cette PE {^{14}C} est diluée avec de la PE non radioactive de façon à avoir l'activité spécifique désirée.

Pour la PE 2-arachidonyl 1 ^{14}C, nous avons utilisé 50 µCi d'acide arachidonique pour la même quantité de 1-acyl lyso PE (25 µmoles). L'activité spécifique obtenue est en moyenne de $1,5\ 10^5$ dpm/µg de phosphore, soit 2,3 mCi/mmoles.

L'hydrolyse de ces PE {^{14}C} par une phospholipase A_2 (venin de Crotalus adamenteus) suivie de l'isolement des produits de dégradation montre que 94 ± 2 % de l'acide linoléique ou arachidonique est incorporée en position 2 de la phosphatidyl éthanolamine.

Essai de l'activité phospholipasique

Ces phospholipides marqués, après évaporation à sec sous un courant d'azote, sont resuspendus dans du tampon Tris 0,2 M pH 7,4 à la concentration de 0,16 µmoles/ml par ultrasonnation pendant 60 secondes avec un générateur NSU 157. Des fractions adéquates de ces dispersions de phospholipides sont ajoutées aux milieux d'incubation qui contiennent en outre du NaCl 0,2 M, du $CaCl_2$ 2 ou 5 mM, entre 50 et 100 µg de protéines membranaires dans un volume total de 1 ml de $NaHCO_3$ 1 mM (toutes les modifications de ce milieu d'incubation standard sont données lors des expériences). Les incubations sont faites dans un bain marie à agitation à 37° et les réactions sont arrêtées par addition de 10 vol. de chloroforme-méthanol (1/2 v/v), ce mélange servant en outre à extraire les lipides.

L'extrait lipidique, évaporé à sec, est repris par du chloroforme-méthanol (1/1 v/v) et chromatographié sur couche mince de silica gel G dans le système chloroforme-méthanol-eau 65/25/4. Les produits de la réaction étant visualisés par autoradiographie, les fractions de gel de silice correspondantes sont récupérées et la radioactivité est mesurée sur la poudre.

L'activité des phospholipases a aussi été étudiée "in situ" sur les phospholipides endogènes.

Marquage de substrats endogènes

Chaque rat reçoit 25 µl d'éthanolamine - HCl {1-2 ^{14}C} par injection intrapéritonéale. Les animaux sont tués par exsanguination 16 heures après l'injection. Dans les membranes plasmiques, 75 % de la radioactivité se retrouve dans la phosphatidyl éthanolamine, 25 % dans la phosphatidyl choline. Pour mesurer l'activité phospholipasique, on incube une quantité de membranes correspondant à 1 mg de protéines. Après incubation, les phospholipides sont extraits et séparés par chromatographie bidimensionelle avec les systèmes de solvant de GRAY (74a) de façon à bien distinguer la LPE de la PC.

1er système - Chloroforme/méthanol/eau : 65/25/4.

2ème système - Tetrahydrofurane, methylal, methanol, NH_4OH 2M 40/20/20/4.

MESURE DE LA RADIOACTIVITE

Pour les composés marqués au ^{14}C, les mesures ont été faites en scintillation liquide à l'aide d'un appareil Nuclear Chicago, modèle 6860 dans 15 ml de scintillateur composé de 0,5 % de PPO (*), 0,03 % de dimethyl POPOP (**) dans du toluène. Les rendements ont été calculés par la technique du rapport des canaux après établissement de la courbe d'étalonnage à partir de solutions standards de toluène ^{14}C.

(*) PPO: 2,5-Diphenyloxazole.

(**) POPOP : 1,4 Di {2-(5-phenyloxazolyl)} benzène.

Les composés marqués au ^{32}P sont comptés à l'aide d'un appareil Nuclear Chicago à passeur de coupelles.

A partir de ces mesures, les activités enzymatiques sont estimées par le calcul du pourcentage du (ou des) produits d'hydrolyse formé (s) par rapport au substrat de départ et les résultats sont exprimés en nmoles de produit d'hydrolyse formé par minute et par mg de protéines membranaires ou simplement en pourcentage lorsqu'il ne s'agit que de comparer les effets de tel ou tel traitement.

ESSAI D'ACTIVATION DES PHOSPHOLIPASES

Préparation de lysat plaquettaire

Le sang étant prélevé sur ACD, les plaquettes après élimination du plasma sont mises en solution dans du tris 0,05 M pH 7,4. Le lysat plaquettaire est préparé à partir de cette solution par congélations et décongélations successives (74) puis il est conservé à l'état congelé.

Essai de l'activation

Les solutions de lysat plaquettaire contiennent entre 0,75 et 1 mg de protéines par ml de tampon tris. Les doses utilisées pour tester l'activation des phospholipases varient entre 20 et 100 µl pour 1 mg de protéines membranaires, soit par essai d'activité phospholipasique 2 à 10 µg de protéines plaquettaires qui sont pré-incubées 10 minutes à 20° en présence des membranes.

ANALYSE DES ACIDES GRAS

Les acides gras sont analysés par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un appareil Girdel. Les acides gras libres (*) contenus dans les membranes sont méthylés sur l'extrait lipidique total par traitement au diazométhane. Les esters méthyliques sont repris par

---

(*) non estérifiés

le pentane et injectés sur colonne chromosorb G 100-200 mesh à 15 % de DEGS. Les quantités d'acides gras sont déterminées par rapport à l'acide arachidique ajouté comme standard interne.

INCORPORATION D'ACIDES GRAS

Pour les études d'incorporation d'acides gras dans les phospholipides des membranes plasmiques, les milieux d'incubation contiennent 1 mg de protéines membranaires, 5 µCid'acides gras fixés sur 0,1 ml d'albumine humaine à 3 %, ATP Na_2 1 mM, CoA 0,1 mM, 5 µg de pénicilline et 5 µg de streptomycine, et du tampon Krebs-Hanseleit. jusqu'à un volume total de 2 ml. Après incubation à 37°, les incubats sont centrifugés à 4° C pendant 5 minutes à 8 000 tours/minute. Les culots sont repris 2 fois par 1 ml d'albumine délipidé pour éliminer le surplus d'acides gras puis 2 fois par 1 ml d'eau distillée avec une centrifugation dans les mêmes conditions après chaque remise en suspension. A la fin, les culots sont extraits au chloroforme-méthanol 1/2 et déposés sur plaque de silica gel G. Après migration bidimensionnelle dans des systèmes de solvants déjà décrits, les phospholipides sont visualisés par exposition à des vapeurs d'iode et par autoradiographie. L'identification des différentes tâches est faite par référence à des témoins et par des colorations spécifiques (coloration à la ninhydrine pour la phosphatidyl éthanolamine et la phosphatidyl sérine). L'identification du phosphatidyl inositol a été faite par incorporation "in vivo" de myo-inositol ^3H. Les tâches correspondant aux phospholipides sont alors récupérées et leur radioactivité est mesurée en scintillation liquide.

Préparation du complexe albumine-acide gras

L'acide gras (1 µCi ≃ 0,1 µmole) évaporé à sec sous courant d'azote est repris par 0,1 ml d'éther éthylique. On ajoute 0,025 ml d'albumine humaine à 3 % dans du sérum physiologique. La fiole étant hermétiquement bouchée, ce mélange est laissé une nuit à 20° puis on évapore l'éther sous courant d'azote avant utilisation.

Préparation de l'albumine délipidé

L'albumine délipidée est préparée selon la méthode de GOODMAN (75) par contact avec du charbon actif en milieu acide. A 7 g. d'albumine humaine dissoute dans 70 ml d'eau, on ajoute 3,5 g. de charbon actif. Ce mélange amené à pH 3 avec 8 ml de ClH N est agité pendant 1 heure à 4° puis centrifugé à 20 000 g. La solution claire d'albumine est neutralisée par NaOH puis lyophilisée pour être conservée. Cette albumine est utilisée pour les lavages des membranes en solution à 1 %.

R E S U L T A T S

- I -

MISE EN EVIDENCE D'ACTIVITES PHOSPHOLIPASIQUES DANS LES MEMBRANES PLASMIQUES DU FOIE DE RAT

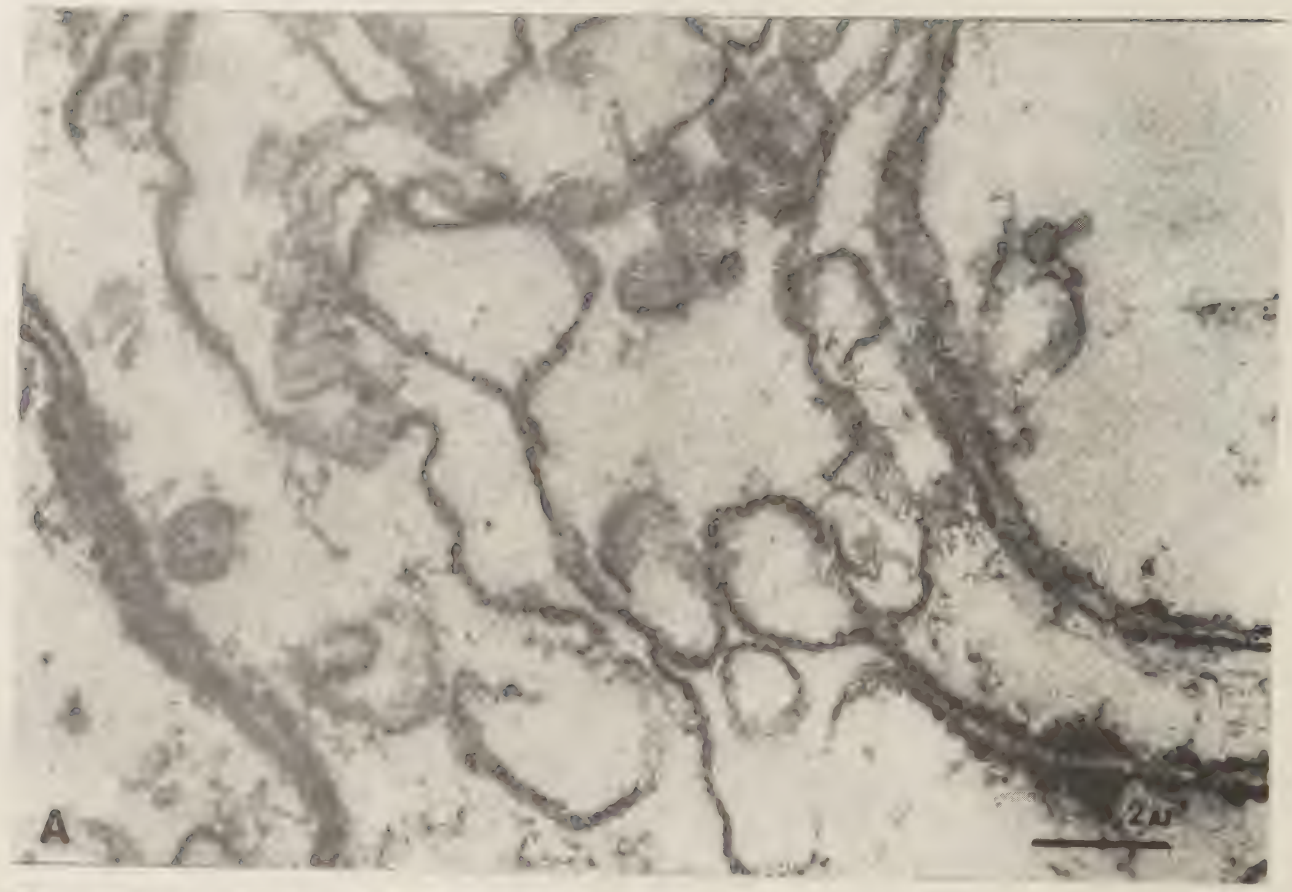
Les membranes plasmiques ont été préparées par la méthode de NEVILLE-EMMELOT sur des rats exsanguinés par ponction intra aortique. L'examen de ces membranes en microscopie électronique montre qu'elles ne contiennent pas de mitochondries entières, de lysosomes ni de noyaux. Le matériel membranaire est essentiellement sous forme de petites vésicules (microcraphie n° 2) ; l'aspect trilaminaire est bien marqué ; on rencontre quelques complexes de jonction (micrographie n° 1) généralement sous forme de feuillets plutôt que de vésicules.

DISTRIBUTION D'ENZYMES MARQUEURS DE FRACTIONS CELLULAIRES

Le tableau I montre les activités spécifiques d'enzymes marqueurs dans l'homogénat de foie total, dans les membranes et dans différentes fractions cellulaires.

Enzymes marqueurs	Membranes plasmiques	Homogénat de foie	Micro-somes	Mito-chondries
5'mono nucléotidase	650	30		
glucose-6 phosphatase	8,6	20	104	
cytochrome oxydase	5	170		480
phospholipases {^{32}P} PG	2,9	0,9		
{^{32}P} PE	1,5		1,1	

Tableau I : Activités spécifiques d'enzymes marqueurs


A
2μ

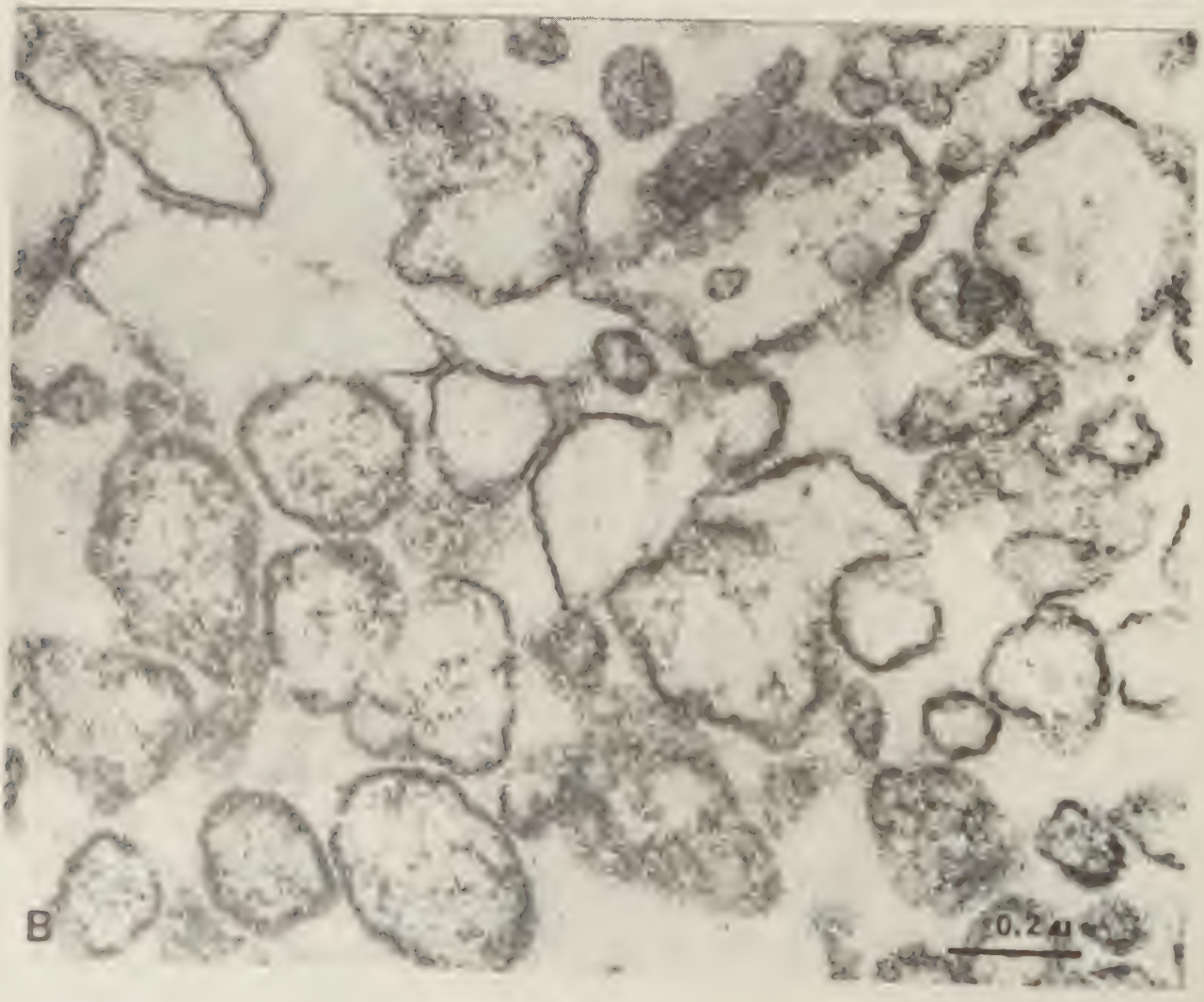

B
0.2μ

Photo n° 1 :

Micrographies électroniques de coupes minces de préparations de membranes plasmiques. L'aspect trilaminaire est très net en A où l'on observe des complexes de jonction avec deux triples-couches de membranes accolées. La micrographie B montre la présence de nombreuses petites vésicules (grossissement 90 000 X).

Nous remercions Mlle ANTEUNIS qui a effectué ces micrographies dans le service du Professeur ROBINEAU (INSERM St Antoine).

Les résultats sont donnés en nmoles de substrat transformé ou de produit formé par minute et par mg de protéines. Les mesures sont faites comme indiqué dans matériel et méthodes. L'hydrolyse des phospholipides est mesurée à pH 7,4 en présence de 16 nmoles de substrat.

La contamination maximum des membranes plasmiques par des mitochondries est d'après l'activité de la cytochrome oxydase d'environ 1 % et la contamination par des éléments du reticulum endoplasmique ne dépasse jamais 10 %. L'activité spécifique de la 5'mono nucléotidase, enzyme localisé principalement dans les membranes plasmiques, est environ 20 fois supérieure dans les membranes que dans l'homogénat de foie.

DEACYLATION DE PHOSPHOLIPIDES EXOGENES

Incubées à pH 7,4 en présence de Ca^{++} et de NaCl, ces préparations membranaires hydrolysent certains phospholipides en lysodérivés: elles contiennent donc une activité phospholipasique de type A. L'hydrolyse du phosphatidyl glycerol est plus importante que celle de la phosphatidyl ethanolamine (Tableau I). La phosphatidylcholine n'est pas dégradée de façon significative.

Pour nous assurer que cette activité n'était pas dûe à une contamination microsomiale, nous avons mesuré, dans les mêmes conditions, l'activité phospholipasique des microsomes : l'activité spécifique, le substrat étant la phosphatidyl ethanolamine, est du même ordre de grandeur dans les microsomes et dans les membranes plasmiques (tableau I) ; 10 % de contamination microsomiale ne peuvent donc pas rendre compte de l'activité phospholipasique observée dans nos préparations membranaires.

Caractéristiques de l'activité phospholipasique

La figure 1 montre l'hydrolyse en fonction du pH de deux phospholipides : le phosphatidyl glycerol et la phosphatidyl ethanolamine.

Le pH optimum des phospholipases membranaires est à 8,5-9 pour ces deux phospholipides. L'hydrolyse de la phosphatidyl ethanolamine présente un deuxième optimum plus faible à pH 7,5 ; cet optimum à pH 7,5 est moins marqué pour le phosphatidyl glycerol.

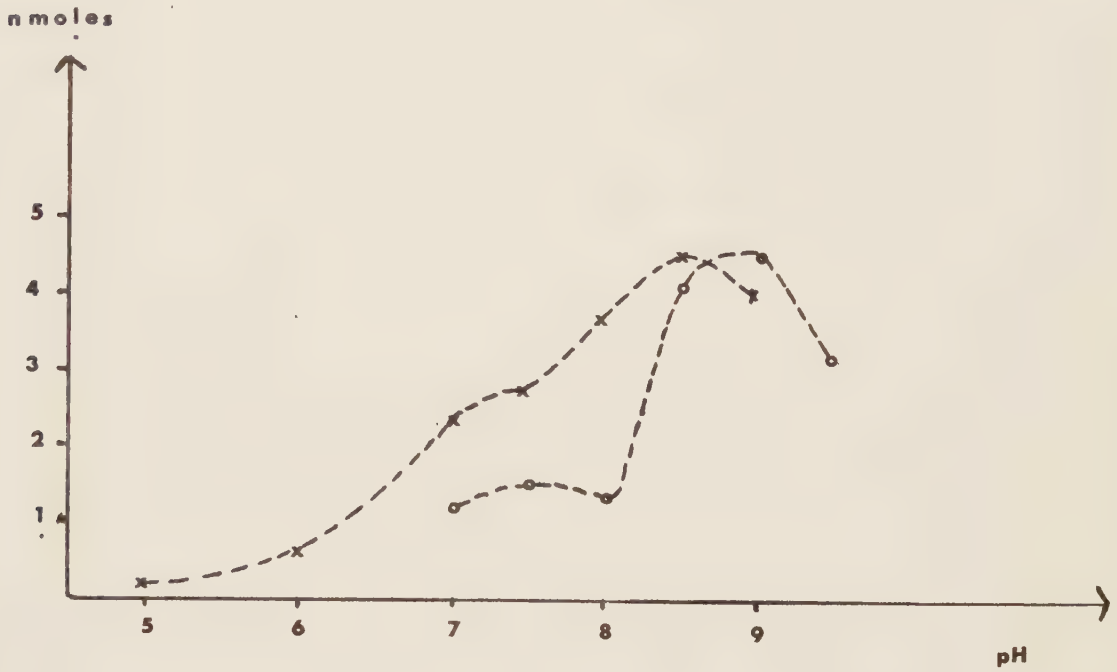


Figure 1 : Activités phospholipasiques en fonction du pH

Les résultats sont en nmoles de phospholipide hydrolysé par minute et par mg de protéine. Les incubations sont faites dans du tampon tris 0,1 M.

x--x hydrolyse du phosphatidyl glycerol $\{^{32}P\}$ PG

o--o hydrolyse de la phosphatidyl ethanolamine $\{^{32}P\}$ PE

A pH 7,4, en l'absence d'ions Ca^{++}, l'hydrolyse du phosphatidyl glycerol est très faible ; elle atteint son maximum pour une concentration du Ca^{++} 5 mM (Figure 2).

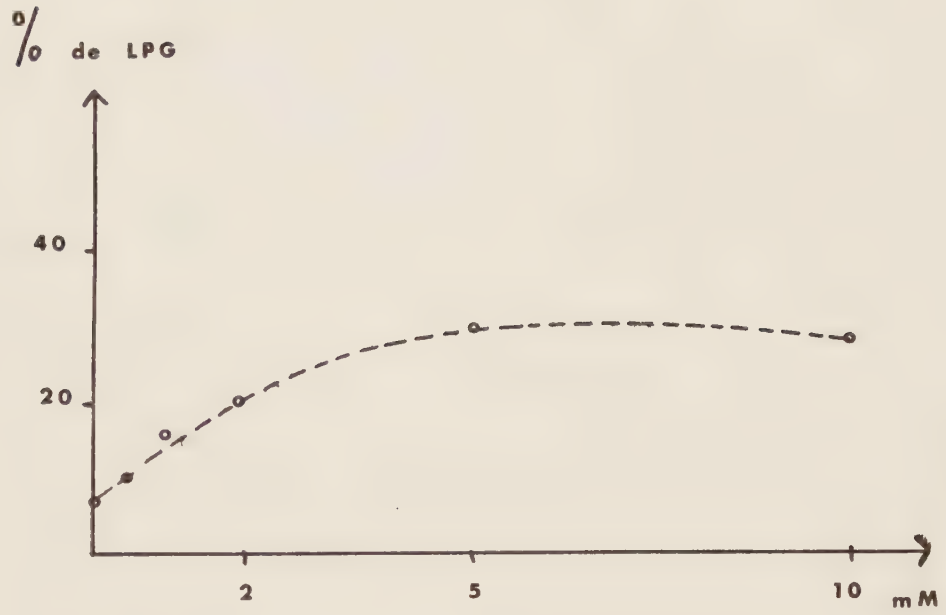


Figure 2 : Influence de la concentration du Ca^{++}

Les résultats sont en % de lysophosphatidyl glycerol formé. Les incubations sont faites dans un tampon $NaHCO_3$ 1 mM pH 7,4.

Outre le Ca^{++}, le NaCl ou le KCl ont un effet favorable (figure 3) sur l'activité phospholipasique membranaire. Les concentrations optimales pour ces deux sels sont très proches (elles sont voisines de 0,2 M). A une concentration molaire, ils deviennent inhibiteurs, mais cette inhibition est réversible : elle disparait après dialyse du NaCl.

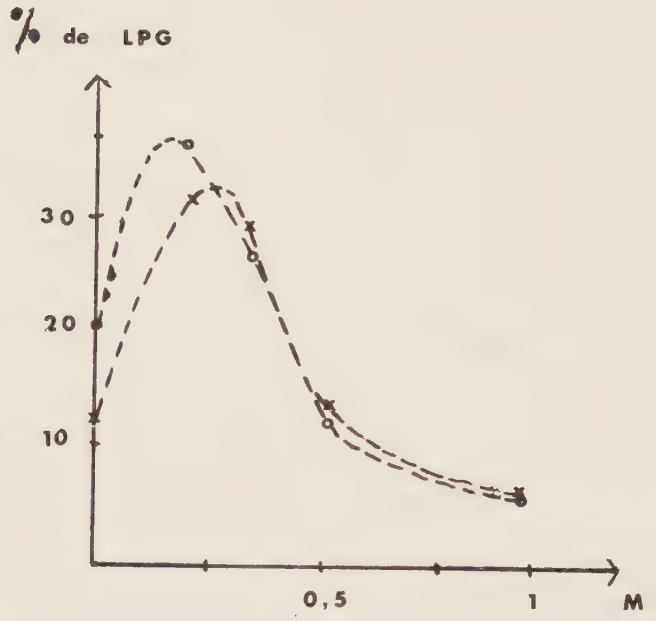


Figure 3 : Influence de la concentration du Na^+ et du K^+

Les résultats sont en % de lysophosphatidyl glycerol formé en 15 minutes d'incubation. Les incubations sont faites dans un tampon $NaHCO_3$ 1 mM pH 7,4 en présence de Ca^{++} 2 mM.

x--x KCl o--o NaCl

DEACYLATION DES PHOSPHOLIPIDES ENDOGENES

Libération d'acides gras à partir des phospholipides endogènes totaux

Les membranes étant marquées par incorporation "in vitro" d'acide oléique ^{14}C sont réincubées en présence des co-facteurs nécessaires à l'activité phospholipasique. Le tableau II montre que 25 % de l'acide oléique qui s'était incorporé dans les phospholipides membranaires se retrouve, après réincubation, dans les acides gras non estérifiés des membranes, acides gras qui ne sont pas libérés dans le milieu d'incubation.

	Membranes témoins	Membranes réincubées
Acides gras	2000	2230
Phospholipides totaux	930	660

Tableau II : Hydrolyse des phospholipides endogènes

Incorporation d'acide oléique : membranes témoins. Le milieu d'incubation contient 0,031 µmole d'acide oléique complexé à l'albumine, 2 mg de protéines membranaires, pénicilline et streptomycine 50 µg/ml, 1mM $ATPNa_2$, 0,1 mM CoA dans un tampon Krebs-Hanseleit jusqu'à un volume final de 2 ml. Les incubations sont faites à 37° pendant 2 heures et arrêtées par centrifugation à 4°. Le culot de membranes est lavé à l'albumine délipidé jusqu'à ce que le surnageant ne contienne plus de radioactivité.

Deacylation des phospholipides : membranes réincubées. Le culot précédent est resuspendu dans 2 ml de tampon Krebs Hanseleit contenant du $CaCl_2$ 5mM et incubé 2 heures à 37°. Les membranes sont alors centrifugées à 4°.

Les lipides sont extraits au chloroforme/méthanol 1/2 et séparés par chromatographie en couche mince dans le mélange éther de pétrole / éther / acide acétique 90/30/1.

Les résultats sont en dpm.

Hydrolyse de la phosphatidyl éthanolamine endogène

Les rats étant marqués "in vivo" à l'éthanolamine {1-$2^{14}C$} nous étudions l'hydrolyse de la phosphatidyl éthanolamine en fonction du temps après adjonction aux membranes de $CaCl_2$ et de NaCl. Les membranes sont incubées au pH optimum de l'activité phospholipasique 8,5. Nous constatons une augmentation de l'hydrolyse au cours du temps. Cette augmentation est linéaire pendant 15 minutes (vitesse initiale de la réaction).

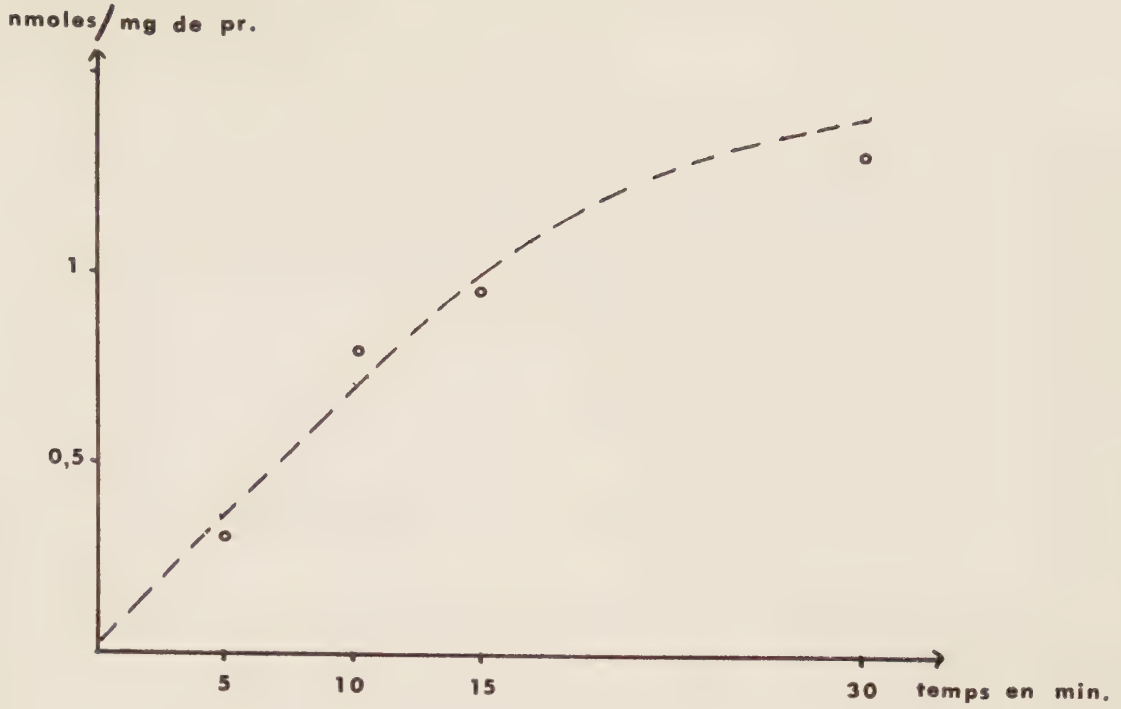


Figure 4 : Hydrolyse de la phosphatidyl éthanolamine endogène

Le marquage "in vivo" des animaux se fait comme indiqué dans Matériel et Méthodes. Les incubations sont faites dans un tampon Tris 0,1 M à pH 8,5. Les résultats sont exprimés en

°--° nmoles de LPE formée pendant le temps de l'incubation.

- II -

SPECIFICITE DES PHOSPHOLIPASES MEMBRANAIRES

SUR DES SUBSTRATS EXOGENES

Spécificité en fonction du type de glycérophospholipide.

Nous comparons l'activité globale des phospholipases membranaires sur trois phospholipides exogènes. Ceux-ci étant marqués au ^{32}P, nous mesurons l'apparition de lysodérivés à pH 7,5 et en présence d'une concentration en substrat de 8.10^{-6} M : dans ces conditions, l'activité phospholipasique est plus importante avec le phosphatidyl glycérol qu'avec la phosphatidyl éthanolamine. La phosphatidyl choline n'est pratiquement pas hydrolysée.

Substrat	Activité spécifique
^{32}P-Phosphatidyl glycerol	2,9
^{32}P-Phosphatidyl ethanolamine	1,5
^{32}P-Phosphatidyl choline	≈ 0

Tableau III : Activité phospholipasique A suivant le type de glycérophospholipide.

Les incubations sont faites à pH 7,5 en présence de 16 nmoles de substrat, de Ca 2 mM, de NaCl 0,2 M dans un volume final de 2 ml.

Spécificité de position : phospholipases A_1 et A_2 et influence de la nature de l'acide gras en position 2.

- Influence du pH

Nous avons vu en utilisant un substrat non spécifique, la ^{32}P-PE (fig. 1) que l'activité phospholipasique globale des membranes présentait deux optimum en fonction du pH, l'un à pH 7,5, l'autre à pH 8,5-9.

L'hydrolyse d'un substrat spécifiquement marqué, en position 2 par de l'acide linoléique 1-^{14}C, à différents pH montre (schéma 5 :)

- Pour la phospholipase A_1, un pH optimum situé entre pH 8,5 et 9 où l'activité phospholipasique est forte (3,5 nmoles/mg de protéines par minute).

- Pour la phospholipase A_2, l'influence du pH est beaucoup moins sensible avec deux optimum de pH 7,5 et 8,5-9. Pour ces deux optimum l'activité phospholipasique est de 1 nmole/mg de protéine/minute.

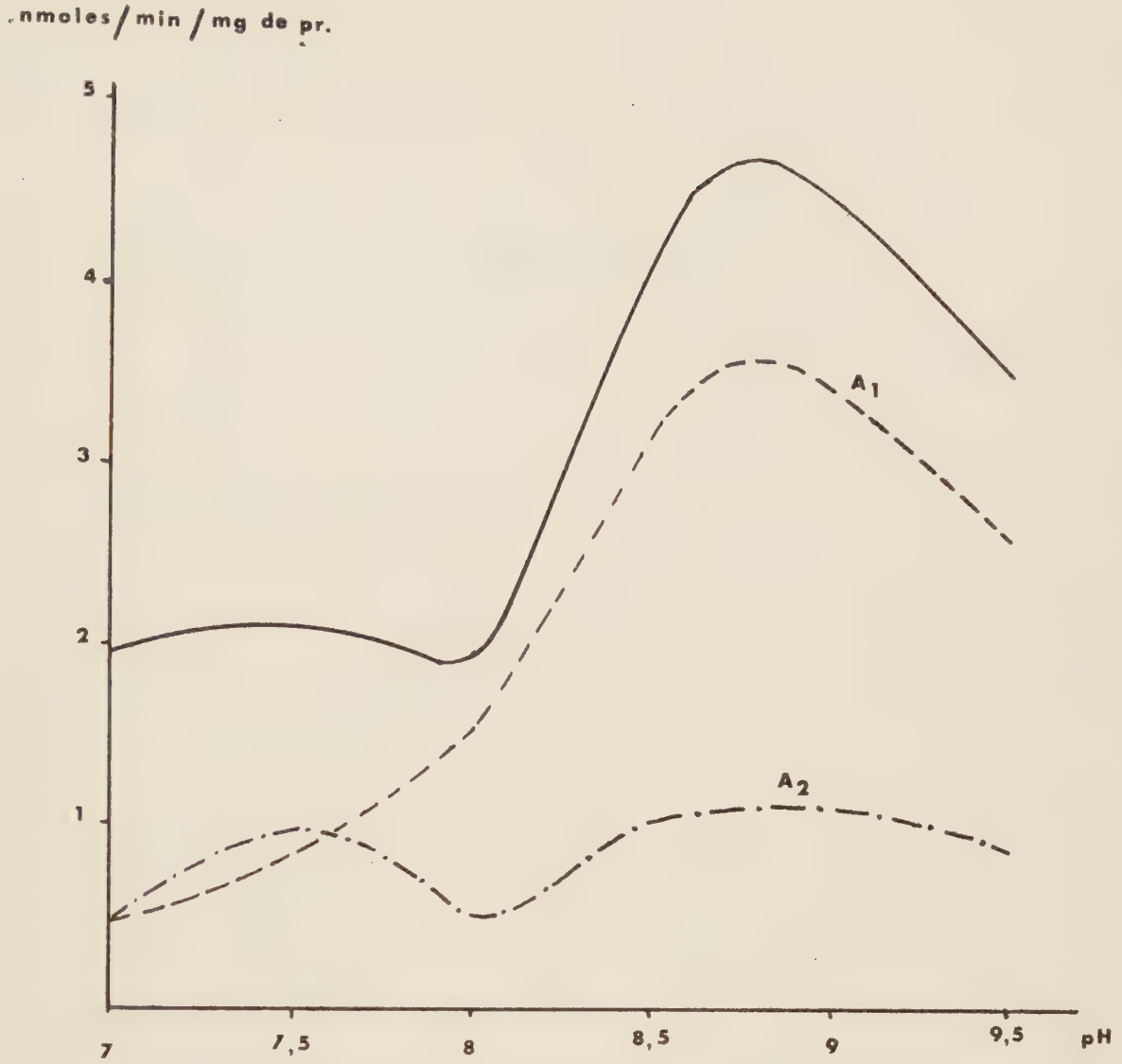


Figure 5 : Activités phospholipasiques A_1 et A_2 en fonction du pH.

-.-.-. Activité phospholipasique A_2

------ Activité phospholipasique A_1

——— Activité totale

En abscisse le pH

En ordonnée les nanomoles de produit formé par mg de protéine et par minute.

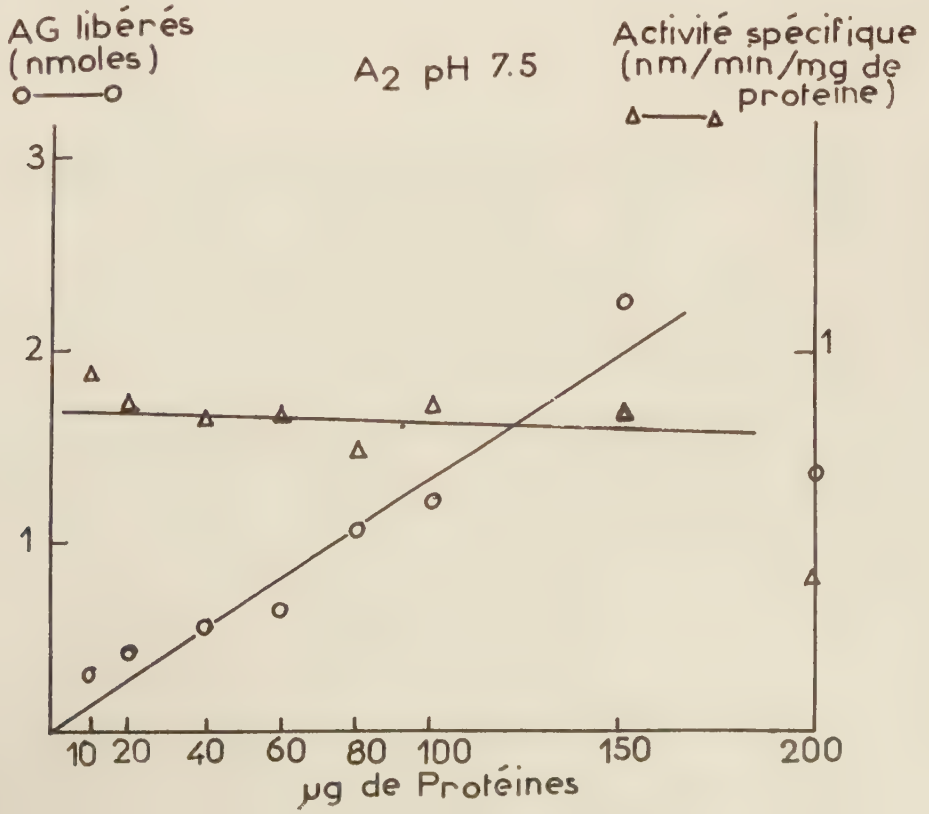
Les milieux d'incubation contiennent 50 µg de protéines membranaires, 32 nmoles de PE-2-linoléique-1 ^{14}C, du Ca 2mM, du NaCl 0,2 M et du tampon tris 0,1 M aux différents pH indiqués jusqu'à un volume final de 1 ml. A la fin de l'incubation, on vérifie que les pH n'ont pas varié. La phospholipase A_1 est évaluée par le taux de LPE ^{14}C formée ; la phospholipase A_2 par le taux d'acides gras marqués hydrolysés.

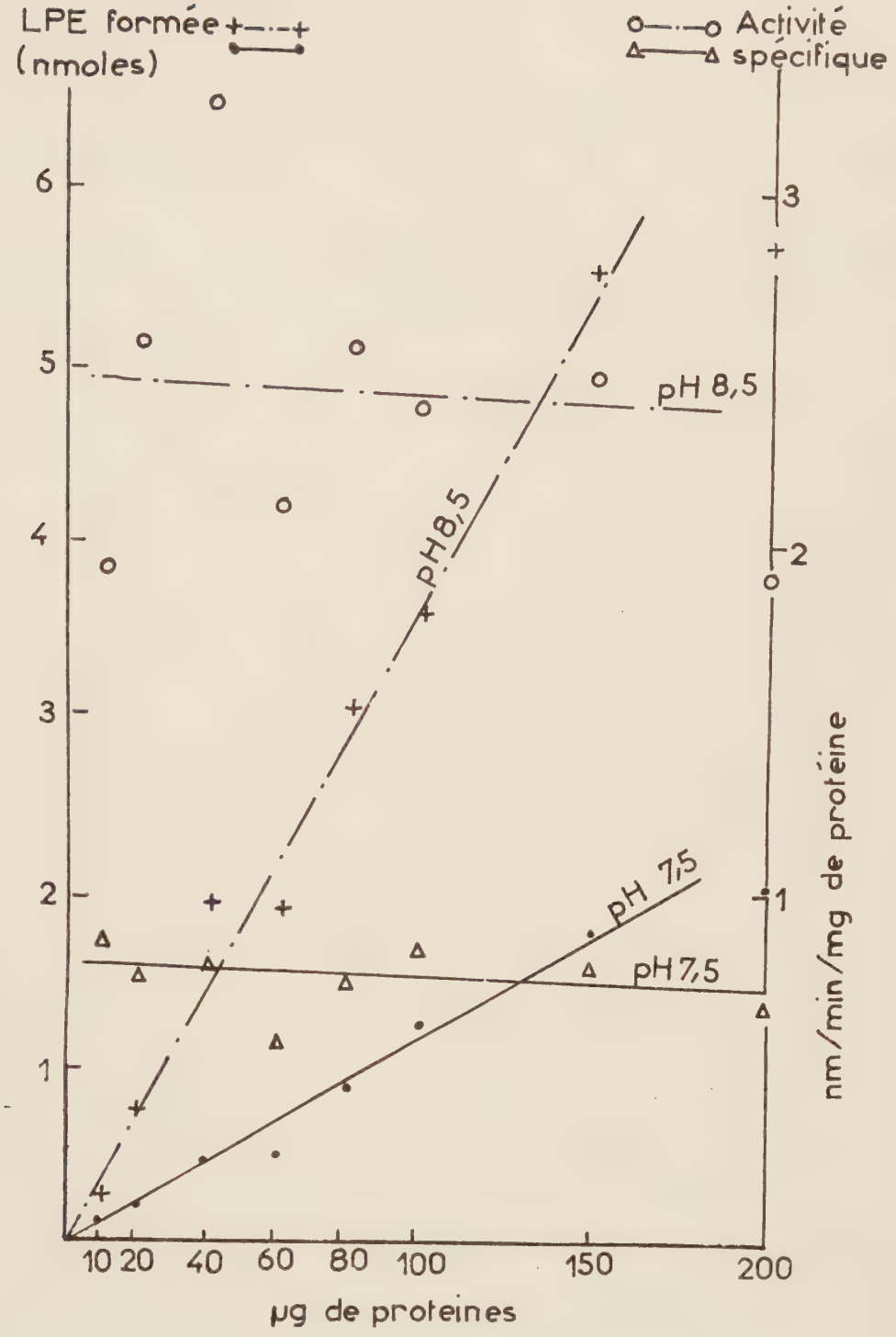
- Influence de la concentration des enzymes

La concentration en substrat étant fixe (32 µM en PE 2-linoléique-1 ^{14}C) nous faisons varier la quantité de protéines membranaires aux deux pH optimum 7,5 et 8,5.

Nous constatons (figure 6) que l'activité de la phospholipase A_1 croît proportionnellement à la concentration en protéines membranaires aux deux pH 7,5 et 8,5 mais l'hydrolyse est nettement supérieure à pH 8,5. Les activités spécifiques restent constantes dans les zones de concentration en protéines utilisées (de 10 à 200 g) elle est de 0,7 nmoles/mg de protéines/minute à pH 7,5 et de 2,4 nm/mg de protéine/minute à pH 8,5.

L'activité phospholipasique A_2 (figure 7) augmente elle aussi avec la concentration des protéines membranaires jusqu'à 150 µg et l'activité spécifique reste constante dans cette zone là (0,8 nmoles par mg de protéines par minute). Il n'y a pas de différences aux deux pH étudiés.





Figures 6 et 7 : Activités phospholipasiques A_1 et A_2 en fonction de la concentration d'enzymes.

Les activités phospholipasiques sont mesurées en présence de PE 2-linoléique-1 ^{14}C 32 µM, de tampon tris 0,1 M avec les co-facteurs habituels : Ca 2 mM et NaCl 0,2 M. Les incubations sont de 15 minutes.

- Influence de la concentration du substrat

Phospholipase A_1

Nous avons étudié l'influence de la concentration en PE-2-linoléique-1 ^{14}C sur l'activité phospholipasique A_1 mesurée à son pH optimum de 8,5 (figure 8).

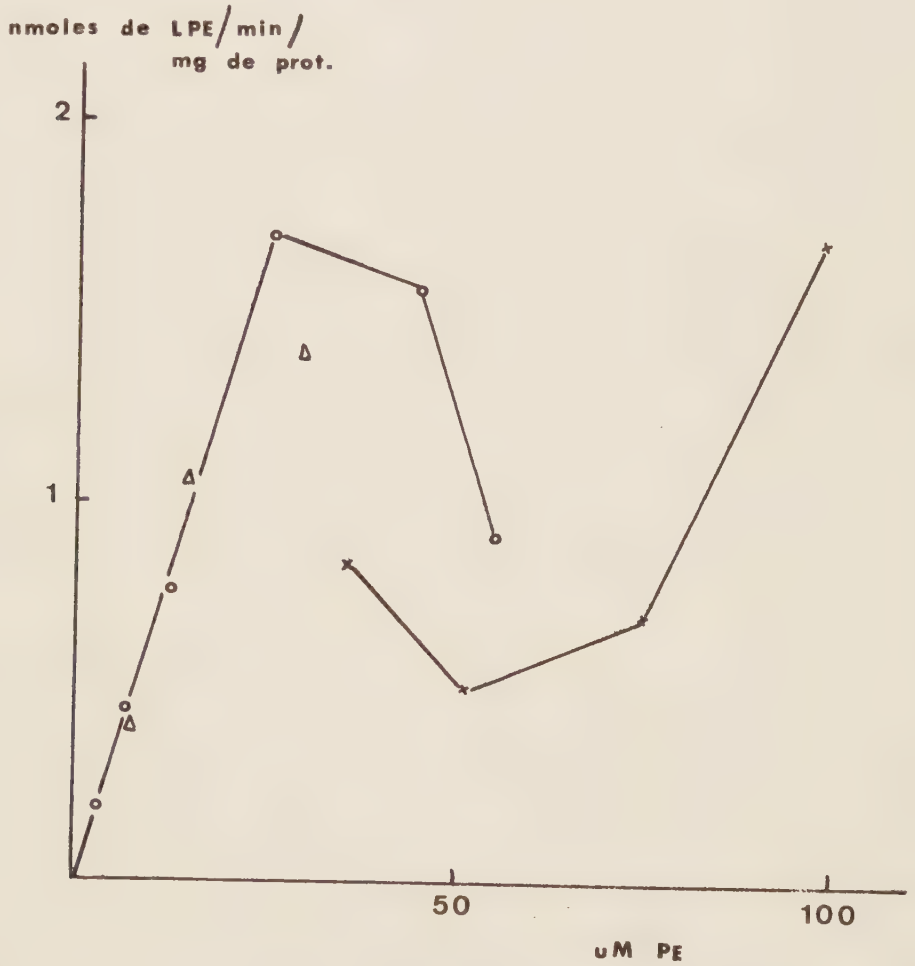


Figure 8 : Activité phospholipasique A_1 et concentration du substrat.

Concentration de la PE-2-linoléique-1 ^{14}C dans la solution mère ultrasonnée

—.—.—. 0,128 mM

x-x-x 0,652 mM

Concentration de la PE-2-arachidonique-1 ^{14}C dans la solution mère ultrasonnée Δ—Δ—Δ—Δ— 0,118 mM.

Les incubations sont faites à pH 8,5 dans un tampon tris 0,1 M en présence de $CaCl_2$ 2mM et de NaCl 0,2 M et de 50 µg de protéines membranaires dans un volume final de 1 ml.

Deux solutions-mères de PE sont utilisées, l'une ultrasonnée à la concentration 0,128 mM, l'autre à la concentration 0,652 mM. La courbe obtenue (vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration en substrat) ne peut s'interpréter par une cinétique Michaelienne. Le décalage entre les deux courbes peut s'expliquer par la différence de forme physique du substrat dans les solutions mères de concentrations différentes lors de l'ultrasonnation. Néanmoins dans les deux cas, il existe une zone critique de concentration du substrat dans le milieu d'incubation (entre 40 et 60 µM) pendant laquelle la vitesse de la réaction enzymatique diminue. Pour de faibles concentrations du substrat, la vitesse réactionnelle est proportionnelle à la concentration et croît très vite ; les expériences réalisées avec l'acide arachidonique, dans cette zone de concentration, donnent des résultats similaires. Pour de fortes concentrations en substrat, la vitesse réactionnelle croît de nouveau. Nous n'avons pu dans ces conditions déterminer ni Vmax, ni Km.

Phospholipase A_2

La phospholipase A_2 ayant deux pH optimum, 7,5 et 8,5, nous avons étudié, pour ces deux pH, l'influence de la concentration en substrat sur la libération d'acides gras marqués à partir de PE-2-linoléique-1-^{14}C et de PE-2-arachidonique-1-^{14}C. Les activités phospholipasiques A_2 augmentent progressivement en fonction de la concentration du substrat pour atteindre des vitesses maximum (Figure 9).

Ces cinétiques peuvent être représentées selon des graphiques de LINEWEAVER et BURKE (Figures 10-11) qui nous permettent de calculer les Km et les Vmax pour les deux substrats et aux deux pH respectifs (Tableau IV).

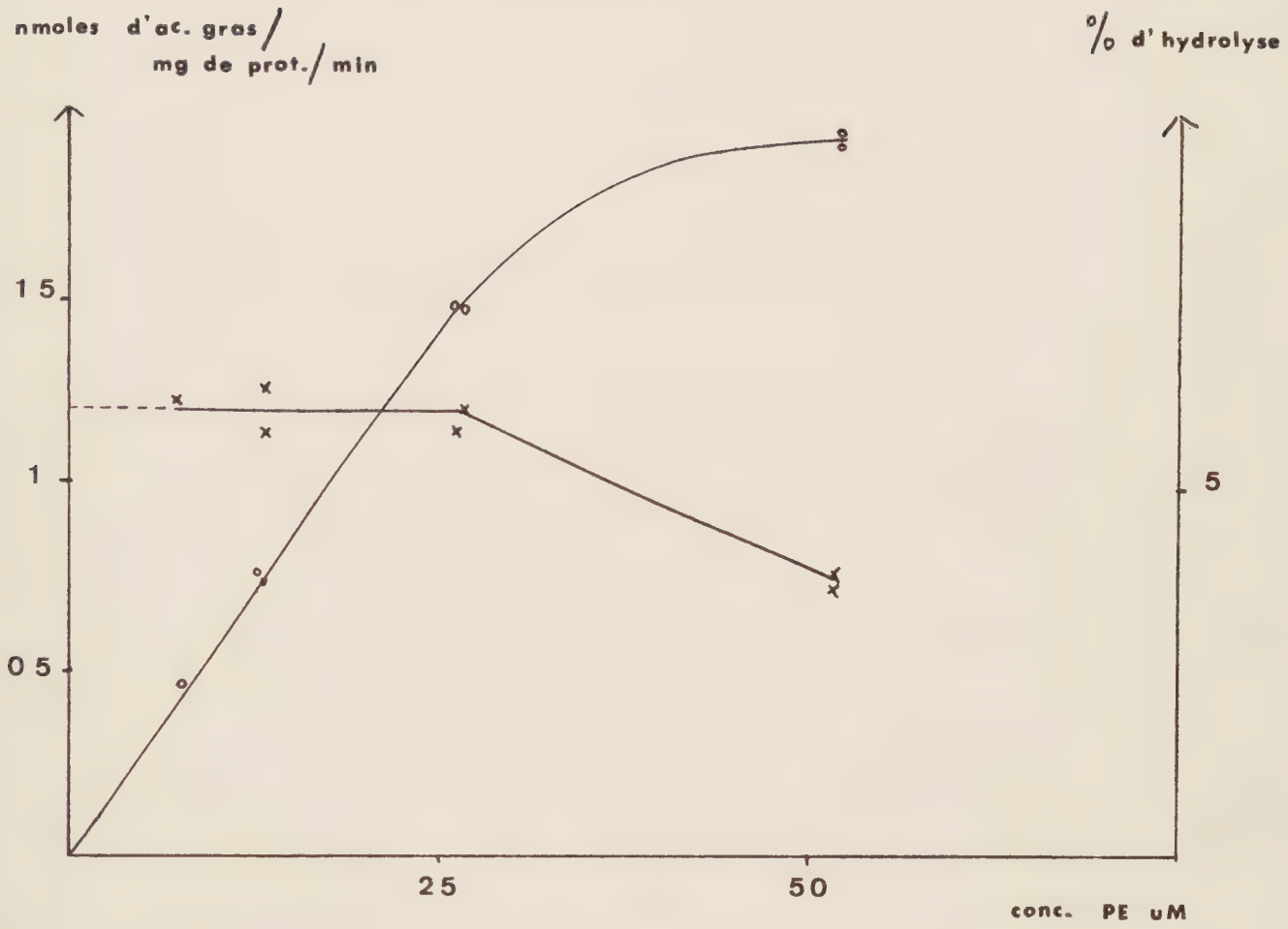


Figure 9 : Activité phospholipasique A_2 à pH 7,5

En présence de PE-2-linoléique-1-^{14}C. Les incubations sont faites dans un tampon tris 0,1 M. en présence de $CaCl_2$ 2mM, de NaCl 0,2 M et de 50 µg de protéines membranaires dans un volume final de 1 ml.

Acide en position 2	pH	Km	Vmax en nmoles
linoléique	7,5	$2,5\ 10^{-5}$	9
	8,5	$7\ 10^{-5}$	7
arachidonique	7,5	$2,5\ 10^{-6}$	3,3
	8,5	$5\ 10^{-6}$	3,3

Tableau IV : Km et Vmax de la phospholipase A_2

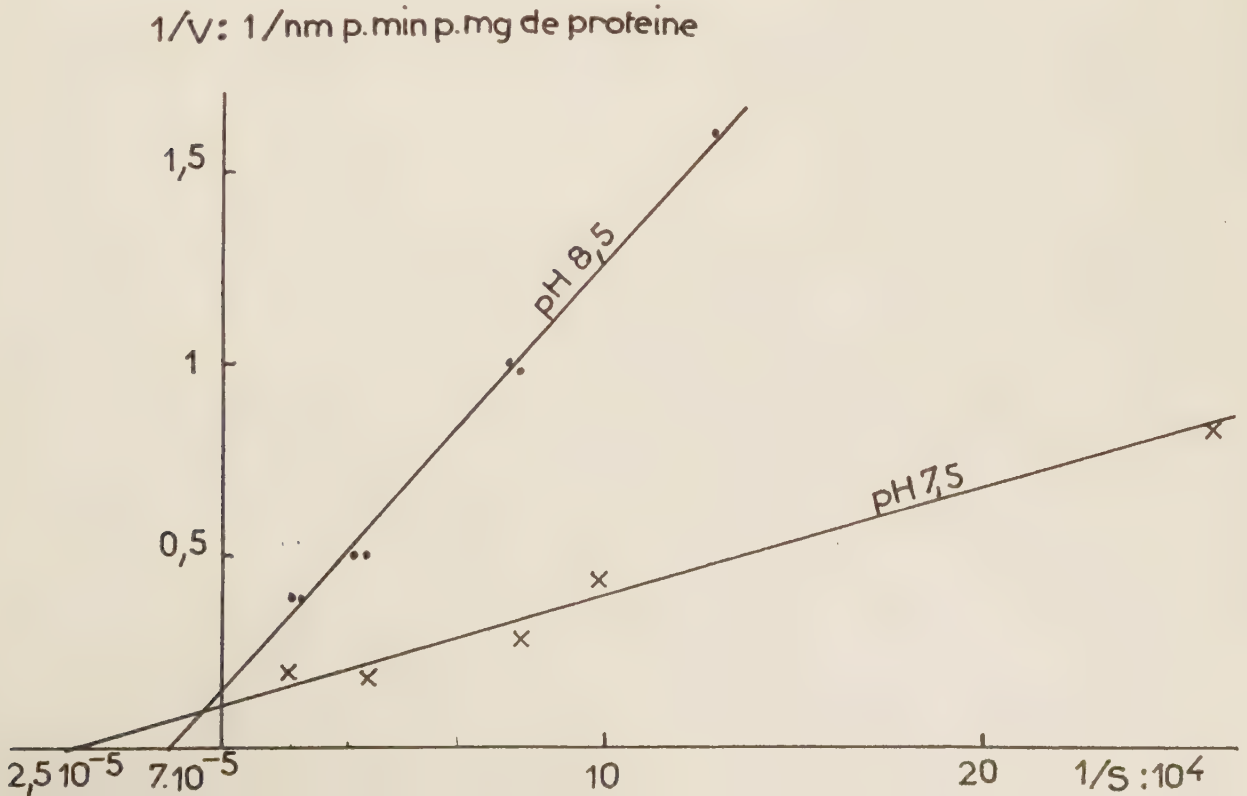
On note pour l'activité phospholipasique A_2 :

- l'absence de zone critique de concentration ;

- une Vmax deux fois plus forte pour la PE-2-linoléique-1-^{14}C que pour la PE-2-arachidonique-1-^{14}C ;

- inversement un Km pour la PE-2-arachidonique-1-^{14}C 10 fois plus faible que pour la PE-2-linoléique-1-^{14}C ;

- que l'activité phospholipasique maximale varie peu pour les deux pH considérés quel que soit le substrat utilisé. Par contre les Km sont légèrement supérieurs à pH 8,5 pour les deux substrats.



Activité A_2 et concentration du substrat.

Figure 10 : Substrat : PE-2-Linoléique-1-^{14}C

solution mère : 0,128 mM pour les faibles concentrations (4 à 64 µM).
solution mère : 0,654 mM pour les fortes concentrations (32 à 96 µM).

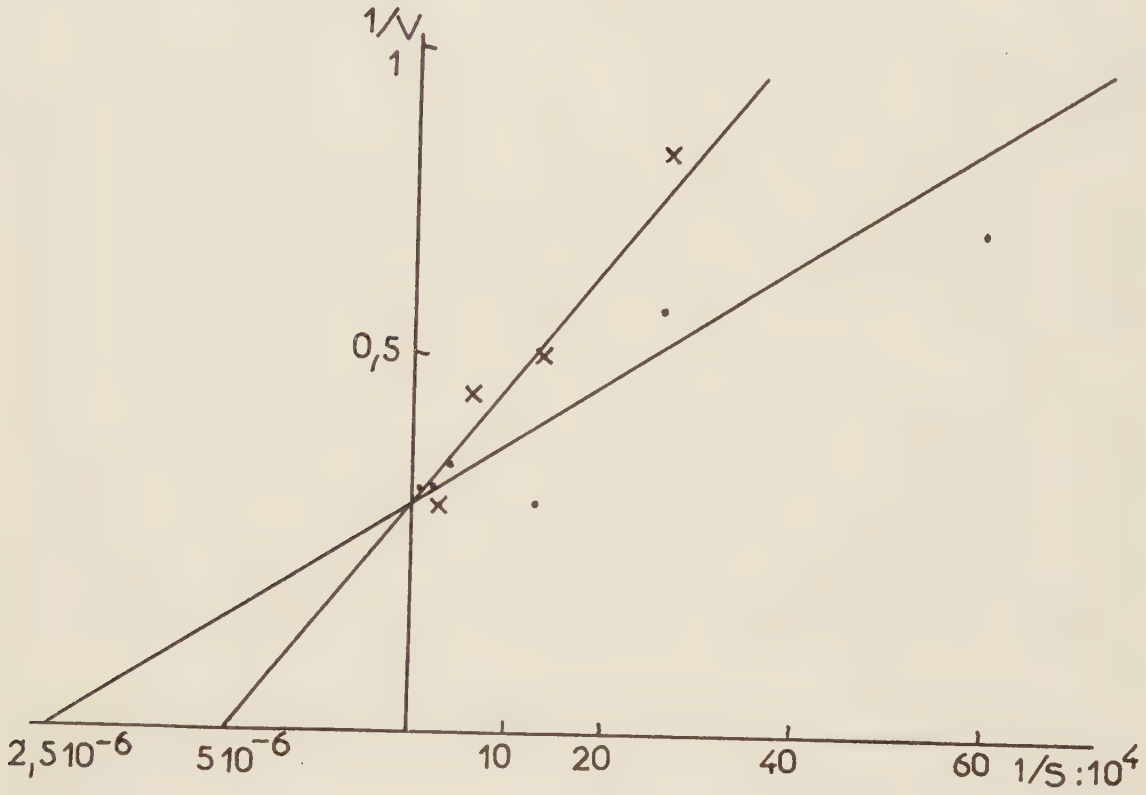


Figure 11 : Substrat : PE-2-arachidonique-1-^{14}C

solution mère : 0,118 mM
Incubation comme figure 9

SPECIFICITE VIS A VIS DES SUBSTRATS ENDOGENES

Pour étudier la spécificité de position de l'activité phospholipasique vis-à-vis des phospholipides endogènes, nous avons analysé par chromatographie gazeuse la nature des acides gras libérés au cours de l'incubation des membranes (Tableau V) dans les conditions où les phospholipases sont actives.

L'incubation pour étudier la libération des acides gras contient 1 mg de protéines membranaires, du Ca 2mM, du NaCl 0,2 M et du tampon tris 0,1 M à pH 8,5 jusqu'à 1 ml. Après extraction des lipides, les acides gras libres sont méthylés au diazométhane après adjonction de 5 µg d'acide arachidique et analysés en chromatographie gazeuse. Les acides gras libres des membranes non incubées sont analysés de la même manière et la différence entre les membranes incubées et les membranes témoins donne la quantité d'acides gras libérés.

On constate que le taux d'hydrolyse des acides polyinsaturés 18:2 et 20:4 est le même (de ce taux d'hydrolyse, nous avons déduit la quantité des autres acides polyinsaturés libérés) et qu'il est supérieur à celui des acides saturés : cette hydrolyse est de 21,5 % pour les acides polyinsaturés contre 13,5 % pour les acides saturés.

Le calcul des activités A_1 et A_2 peut se faire de deux manières :

En considérant que les phospholipases sont spécifiques des acides saturés ou des acides polyinsaturés, les monoinsaturés se répartissant également selon les deux phospholipases, ce qui donne :

pour la A_2, 5,2 µg d'acide gras libéré soit 1,20 nmoles/mg de protéines/minute ;

pour la A_1, 3,1 µg d'acide gras libéré soit 0,76 nmoles/mg de protéines/minute

Acides gras	1 µg d'ac. gras/mg de prot. dans PE + PS + PI			2 Ac. gras libérés		3	
	total	Sn1	Sn2	µg	%	Sn1	Sn2
16:0	8,6	6,5	2,1	2	23	1,7	0,4
18:0	18,2	15,9	2,3	0,9	5	0,4	0,5
18:1	4	1,55	1,45	0,4	10	0	0,4
18:2	4,1	0	4,1	0,9	22	0	0,9
20:4	9,1	0	9,1	1,9	21	0	1,9
autres AG PI (*)	10,4	0	10,4	2,2	21	0	2,2
Σ saturés	26,8	22,4	4,4	2,9	13,5	2,1	0,9
Σ PI	23,6	0	23,6	5,0	21,3	0	5

Tableau V : Quantités d'acides gras non estérifiés présents dans les membranes.

1 - µg des différents acides gras/mg de protéines membranaires présents dans l'ensemble des trois phospholipides : PI, PE et PS et en position Sn1 et Sn2 de ces mêmes phospholipides. Ces chiffres ont été calculés à partir de l'étude des différentes espèces moléculaires de phospholipides des membranes plasmiques faite par RWOOD (33).

2 - µg des différents acides gras libérés lors de l'incubation de 1 mg de protéines membranaires. Les pourcentages de chacun des acides gras libérés sont évalués par rapport aux quantités d'acides gras calculés en 1.

3 - µg d'acides gras/mg de protéines membranaires ayant pu être hydrolysés sur les positions Sn1 et Sn2. Ces chiffres sont calculés par rapport aux quantités d'acides gras en position Sn1 et Sn2 de la colonne 1 et d'après les taux d'hydrolyse de la colonne 2.

(*) AG PI : acides gras polyinsaturés.

- selon que la phospholipase A_2 est spécifique de la position en 2 des acides gras. Or une fraction non négligeable d'acides saturés se trouve en position 2 et peut dans ce cas être hydrolysée par la phospholipase A_2. En se basant pour évaluer l'activité A_2 sur le taux d'hydrolyse des acides polyinsaturés situés uniquement en position 2, soit 21 % d'hydrolyse, 0,9 µg d'acides saturés (21 % de ceux qui sont en position 2) peuvent l'être par la phospholipase A_2, ce qui donne pour les activités A_1 et A_2 :

A_2 : 6,3 µg d'acides gras libérés, soit 1,4 nmoles/mg de protéines/minute ;

A_1 : 2,1 µg d'acides gras libérés, soit 0,52 nmoles/mg de protéines/minute.

L'activité phospholipasique A_2 sur les phospholipides endogènes est donc toujours supérieure à l'activité phospholipasique A_1. Or pour ce même pH 8,5, l'activité A_1 sur les phospholipides exogènes est 3 fois plus importante que l'activité A_2.

HYDROLYSE D'UN SUBSTRAT ENDOGENE EN PRESENCE D'UN SUBSTRAT EXOGENE

La figure 12 montre que l'hydrolyse de la phosphatidyl éthanolamine endogène (marquée "in vivo" par l'éthanolamine $^{1-2\,14}C$) diminue lorsqu'on incube les membranes en présence de quantités croissantes de phosphatidyl éthanolamine exogène. Ces incubations ont été faites à pH 7,5, pH pour lequel l'activité A_1, faible sur les phospholipides exogènes, est négligeable sur les phospholipides endogènes. C'est donc une diminution apparente que nous observons par addition de PE exogène froide.

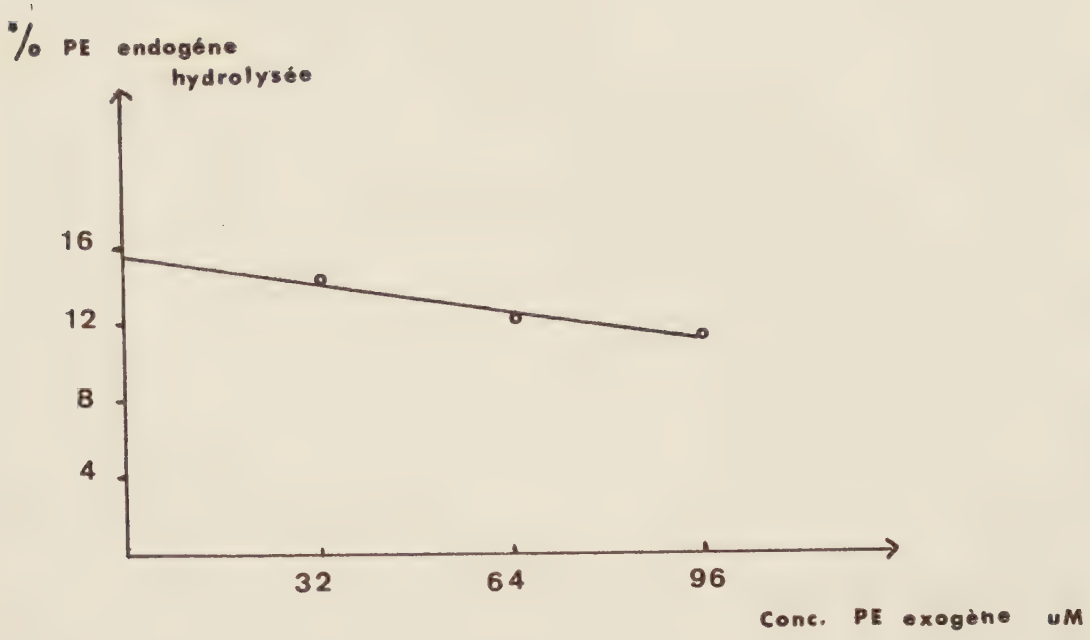


Figure 12 : Hydrolyse de PE endogène en présence de PE exogène.

Les incubations sont de 30 minutes dans un tampon tris 0,1 M à pH 7,5. Chaque incubation contient 120 µg de protéines membranaires La PE exogène non radioactive est ultrasonnée dans les conditions utilisées pour les substrats marqués.

- III -

INFLUENCE DES CONDITIONS DE PREPARATION ET ROLE D'UN FACTEUR PLAQUETTAIRE

VARIABILITE DES RESULTATS

On note une très grande diversité des résultats concernant les activités phospholipasiques A_1 et A_2 selon les auteurs (76, 77, 78) et selon les préparations membranaires puisque NEWKIRK et WAITE (79) qui ont évalué les activités phospholipasiques de préparations d'origines diverses sur une Sn1-acyl 2-linoleyl phosphatidyl ethanolamine constatent (tableau VI) des variations importantes : d'un facteur 4 pour la phospholipase A_1, d'un facteur 10 pour la phospholipase A_2.

	Préparations membranaires			
	1	2	3	4
Phospholipase A_1	8,6	2,7	5,5	2,0
Phospholipase A_2	3,4	0,3	2,0	0,3

Tableau VI : Comparaison par WAITE (79) des activités phospholipasiques A_1 et A_2 de diverses préparations membranaires.

Les résultats sont en nmoles de substrat transformé par minute et par mg de protéines avec comme substrat du 1-acyl 2-linoleyl phosphatidyl ethanolamine 60 10^{-3}µM.

1. Membranes préparées dans le laboratoire de M. WAITE
2. Membranes fournies par Dr VICTORIA
3. Membranes préparées par C.T. RANKIN
4. Membranes fournies par Dr FLEISHER

Nous avons testé les activités phospholipasiques des membranes préparées selon deux méthodes différentes : la méthode de RAY et la méthode de NEVILLE-EMMELOT (tableau VII).

	A_1	A_2
Méthode RAY	0,73	0,4
Méthode EMMELOT	0,41	0,9

Tableau VII : Activités phospholipasiques et méthodes de préparation

Les incubations sont faites à pH 8,5 avec comme substrat la 1-acyl 2-linoleyl phosphatidyl ethanolamine 11 10^{-3} µM.

Pour la concentration de substrat utilisé (11 10^{-3} µM), le rapport des activités A_1/A_2 s'inverse d'une préparation à l'autre. Les membranes préparées par la méthode de RAY ont une contamination microsomiale supérieure mais qui ne suffit pas seule à expliquer ces différences.

INJECTION D'HEPARINE ET PERFUSION DES FOIES

Nous avons fait varier les conditions de prélèvement du foie des rats et de traitement des animaux. En particulier, nous avons comparé les activités phospholipasiques de quatre lots de membranes selon que les rats ont ou n'ont pas reçu une injection d'héparine et selon que leur foie a ou n'a pas été perfusé (tableau VIII).

	Exsanguination par ponction intra-aortique	Perfusion des foies avec du NaCl 9 ‰	
Rats héparinés	0,8	0,53	A_1 0,04 A_2 0,4
Rats non héparinés	2,4	1,9	A_1 1,1 A_1 0,8

Tableau VIII : Activités phospholipasiques et traitement des animaux.

L'injection d'héparine est de 500 Unités par rat. Les foies sont perfusés par du sérum physiologique. Les activités phospholipasiques sont évaluées à pH 8,5 en présence de PE 2 linoléique $1^{14}C$ 32 µM ; elles sont exprimées en activité spécifique (nmoles/min/mg de protéines).

L'activité maximum observée est obtenue lorsque les rats sont simplement exsanguinés et n'ont pas reçu d'injection d'héparine. la perfusion des foies n'entraîne qu'une faible diminution d'activité phospholipasique alors que pour des rats héparinés, l'activité enzymatique des membranes plasmiques du foie est réduite au moins des 2/3: dans ce cas, la phospholipase A_1 a presque totalement disparu, l'activité A_2 est fortement diminuée.

REACTIVATION PAR UN FACTEUR PLAQUETTAIRE

Cependant sur les membranes préparées à partir de rats héparinés dont les foies ont été perfusés et qui possèdent donc une activité phospholipasique A_2 très faible (tableau VIII), il est possible de faire réapparaître une activité A_2 forte en les incubant en présence d'un lysat de plaquettes de rats (80). ETIENNE et coll. (81) ont

montré que le lysat de plaquettes de rats contient un facteur thermosensible capable d'activer certaines phospholipases plasmatiques et érythrocytaires. La nature de ce facteur est encore mal connue : c'est une macromolécule de poids moléculaire supérieur à 200 000 dont la délipidation douce entraîne la perte des propriétés activatrices. Ces propriétés n'étant pas restaurées par addition de ces mêmes lipides, on peut se demander s'il s'agit d'une lipoprotéine dont l'apoprotéine serait dénaturée au cours de la délipidation.

Nous constatons que ce facteur plaquettaire active la phospholipase A_2 membranaire ; il est sans action sur la phospholipase A_1. (Tableau IX).

	Sans facteur plaquettaire		Avec facteur plaquettaire	
Activités phospholipasiques	0,53	A_1 0,04 A_2 0,4	2,4	A_1 0,1 A_2 2,1

Tableau IX : Activation de la phospholipase A_2 par le facteur plaquettaire.

Les membranes sont préparées à partir de rats ayant reçu une injection d'héparine et dont les foies sont perfusés. Les membranes sont pré-incubées, lorsqu'indiqué, en présence de 10 µl de lysat plaquettaire par mg de protéines membranaires. Les milieux d'incubation contiennent 50 µg de protéines membranaires et de la PE-2 linoleyl-1^{14}C 32 µM dans un tampon tris pH 8,5.

L'étude des acides gras libérés lorsque les membranes sont incubées en présence de lysat plaquettaire confirme que celui-ci active bien la phospholipase A_2 (tableau 10). Par rapport à des membranes incubées sans lysat plaquettaire, la quantité d'acide linoléique libre présent dans les membranes est multipliée par 2

et la quantité d'acide arachidonique par 5 ; les autres acides gras n'augmentent pratiquement pas. Au total, la quantité d'acides gras libérés en présence de lysat plaquettaire est de 20 µg par mg de protéines membranaires ; or la quantité d'acide gras liée aux phospholipides de la membrane est d'environ 120 µg ce qui représente pour l'ensemble des phospholipides une hydrolyse moyenne de 16 %.

Acides gras libres des membranes		Sans lysat plaquettaire	Avec lysat plaquettaire
palmitique	16:0	11	13
palmitoléique	16:1	2	2
stéarique	18:0	24	28,6
oléique	18:1	4,4	5,6
linoléique	18:2	4,6	8,4
arachidonique	20:4	2,6	12,2
Σ AG saturés		35	41
Σ AG insaturés		13,6	28,2

Tableau X : Acides gras non estérifiés présents dans les membranes après incubations.

Les résultats sont en µgrammes d'acides gras par mg de protéines membranaires. On incube 1 mg de protéines membranaires avec ou sans 0,1 ml de lysat plaquettaire pendant 60 minutes à 37° : après incubation, l'extrait lipidique au chloroforme méthanol 1/2 est amené à sec puis repris par l'éther et méthylé au diazométhane. Les acides gras sont alors analysés par chromatographie en phase gazeuse avec de l'acide arachidique en témoin interne.

Ainsi l'activité phospholipasique A_2 des membranes est fortement diminuée après injection d'héparine aux rats mais l'incubation de ces membranes en présence d'un facteur plaquettaire fait réapparaître

une activité A_2 forte. Le fait que ce facteur activateur n'agisse qu'après lyse des plaquettes nous permet d'envisager une explication de l'action de l'héparine vis-à-vis de la phospholipase A_2. Lors de la préparation de membranes à partir de foies de rats simplement exsanguinés par ponction intra-aortique, on peut penser qu'il y a lyse des plaquettes du sang contenu dans le foie (cette technique d'exsanguination ne débarrassant que partiellement de son sang le lit vasculaire hépatique). L'héparine préalablement injectée à l'animal agirait en empêchant la lyse des plaquettes. L'activité qui persiste après héparinisation des animaux peut être dûe soit à la persistance d'une faible lyse plaquettaire, soit à la fraction des phospholipases A_2 physiologiquement actives. Le fait que cette activité de base persiste même après perfusion des foies nous fait pencher vers cette deuxième hypothèse.

INFLUENCE DU pH SUR LES ACTIVITES PHOSPHOLIPASIQUES A_2

Sur le schéma 13 sont rassemblés les résultats concernant l'influence du pH sur les activités phospholipasiques A_2 des membranes

- provenant de rats simplement exsanguinés (1)
- provenant de rats héparinés et perfusés (2)
- ou de ces dernières après reactivation (3)

L'allure générale des courbes est identique avec deux optimum à pH 7,5 et à pH 8,5-9, optimum pour lesquels l'activité spécifique est sensiblement identique pour chacune de ces courbes. L'activité spécifique moyenne de chacune de ces membranes est fonction du degré d'activation : faible pour les membranes de foies de rats héparinés, maximale pour les membranes réactivées par le facteur plaquettaire, les membranes de rats exsanguinés ayant une activité intermédiaire.

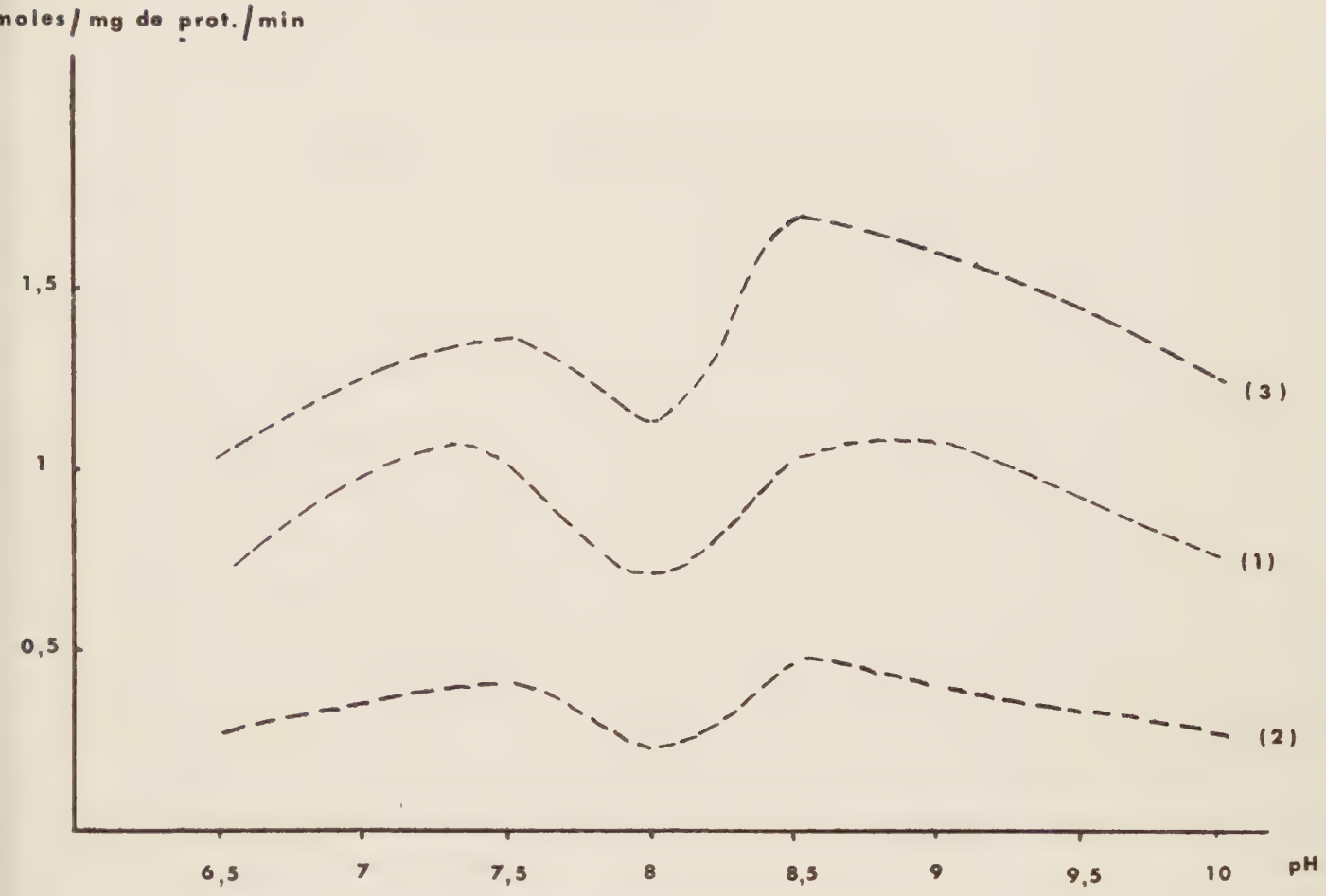


Figure 13 : Activités phospholipasiques A_2 en fonction du pH

Les résultats sont exprimés en activité spécifique. Les incubations sont faites soit dans un tampon tris pour les membranes (1), soit pour les membranes (2) et (3) dans un tampon glycylglycine entre pH 6 et pH 8,6 et dans un tampon glycine NaOH de pH 8,6 à pH 10,5.

(1) Membranes provenant de rats simplement exsanguinés

(2) Membranes provenant de rats héparinés et perfusés

(3) Membranes (2) après reactivation.

- IV -

LIAISONS DES PHOSPHOLIPASES A LA MEMBRANE

Nous avons étudié l'effet des différents traitements sur la liaison entre les phospholipases et la membrane plasmique. Ces traitements, susceptibles d'entraîner une solubilisation des phospholipases membranaires, sont les ultrasons, la force ionique, la congélation-décongélation. Les membranes étant préparées à partir de rats non héparinés, simplement exsanguinés, des fractions membranaires équivalentes sont soumises aux différents agents puis centrifugées à 12 000 g pour séparer la phase soluble du matériel sédimentable. L'activité des phospholipases solubilisées est donnée dans le tableau suivant.

	Activité phospholipasique
Suspension dans HCO_3^- 1mM	0,6
Ultra sonnation	1,0
NaCl M	3
3 extractions par NaCl M	4
3 congélations et décongélations successives	0,7

Tableau XI : Solubilisation de l'activité phospholipasique.

Hydrolyse du ^{32}P - Phosphatidyl glycerol par les fractions solubles résultant des différents traitements. Les résultats sont exprimés en nmoles de substrat hydrolysé par mg de protéines de départ (avant centrifugation) et par minute.

La force ionique élevée est donc le seul des facteurs physiques étudiés qui permette le détachement des phospholipases membranaires.

ETUDE DE LA LIBERATION DES PHOSPHOLIPASES PAR LE NaCl

La figure 14 montre la solubilisation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration en NaCl et qu'elle croît régulièrement avec celle-ci, c'est-à-dire lorsque la force ionique augmente.

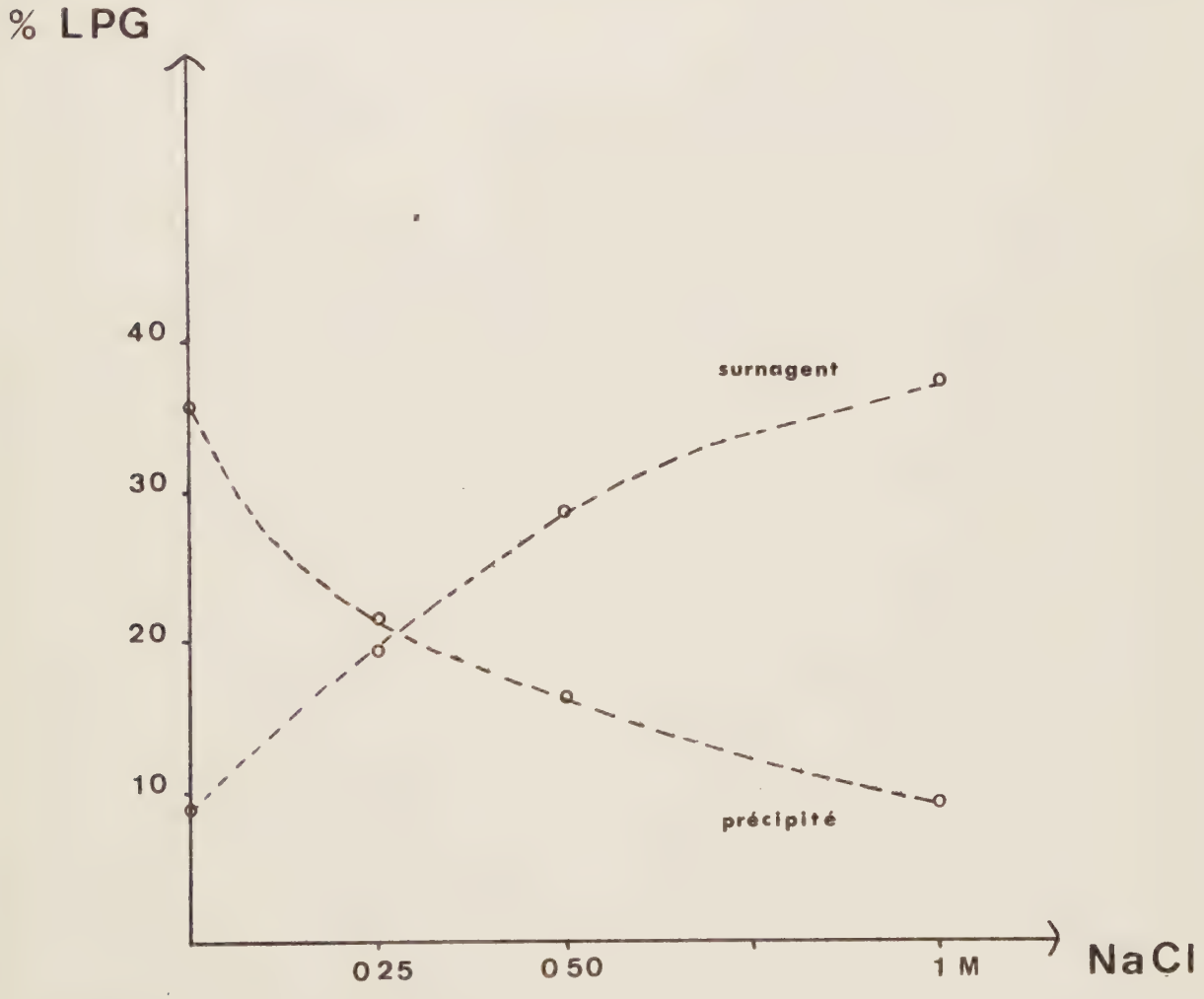
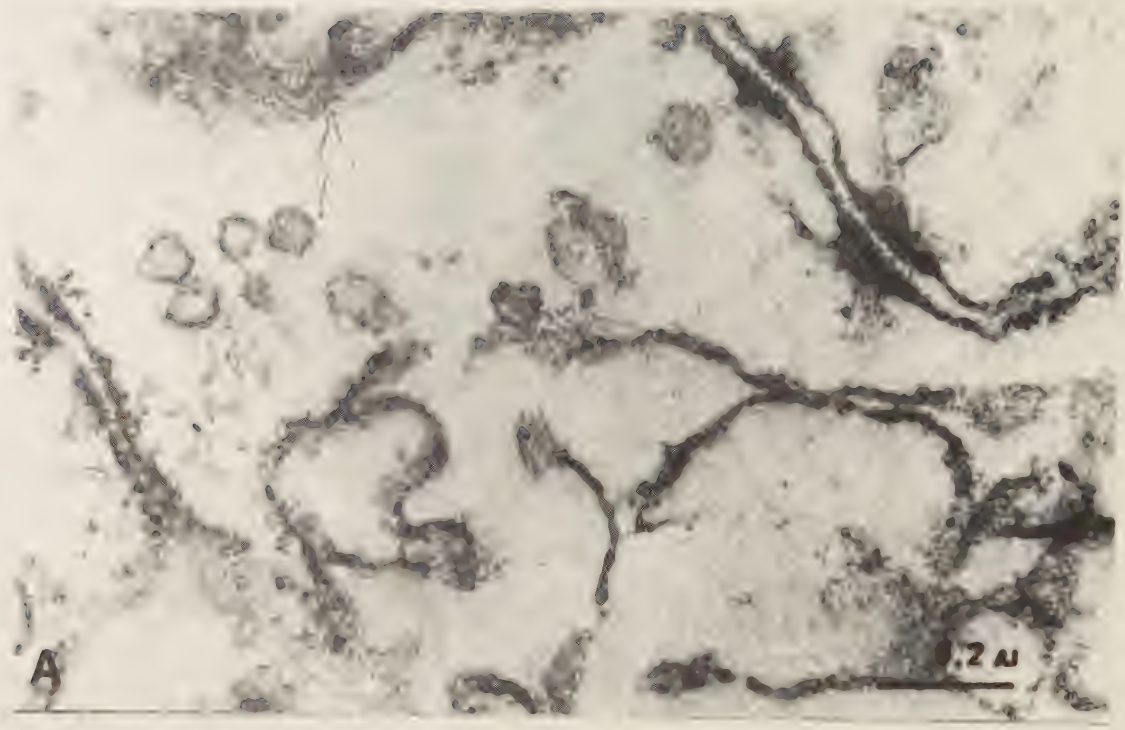


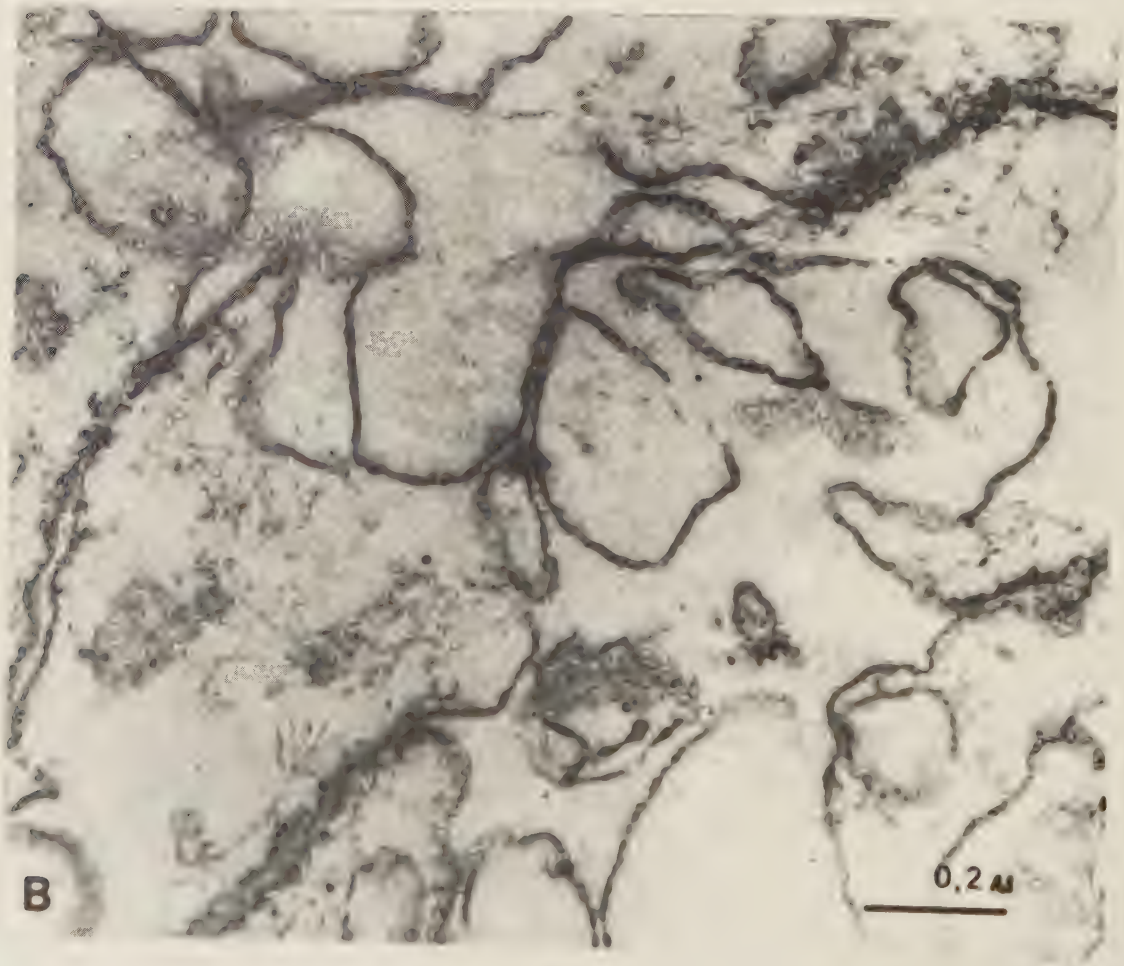
Figure 14 : Solubilisation de l'activité phospholipasique par le NaCl

Les membranes sont suspendues dans différentes concentrations en NaCl puis sédimentées à 12 000 g au bout de 10 minutes. Le culot est repris par un volume égal au surnageant et les activités sont dosées sur une aliquote identique du surnageant et de la resuspension membranaire.

Substrat : ^{32}P-phosphatidyl glycerol

+-+ surnageant, Δ-Δ culot membranaire





2

Cette solubilisation des phospholipases dépasse 80 % pour une concentration molaire en NaCl, tandis qu'elle n'est que de 30 % pour l'ensemble des protéines membranaires, ce qui entraîne une augmentation de l'activité spécifique d'environ 2 fois 1/2 (Tableau XII). Il y a donc détachement préférentiel de la (ou des) phospholipases.

Concentration du NaCl	Activité phospholipasique	
	culot	surnageant
0,25 M	1,1	1,9
0,5 M	0,34	5,3
M	0,17	7,6
Membranes témoins	2,9	

Tableau XII : Activités spécifiques des fractions surnageantes et précipitables après traitement par le NaCl.

Les membranes sont traitées comme figure 14, les protéines (méthode de LOWRY) et l'activité phospholipasique étant dosée sur chacune des fractions surnageantes et sédimentables.

Action du NaCl M sur les constituants membranaires

- Examen au microscope électronique

Nous avons examiné au microscope électronique des membranes plasmiques intactes, des membranes traitées par le NaCl M et des membranes dont le NaCl M a été dialysé. Après mise en suspension dans du NaCl M, les membranes conservent leur structure trilaminaire avec une épaisseur constante de 95-100 Å et on observe toujours de nombreux complexes de jonctions (photo 2-A). L'aspect vésiculaire est préservé mais on note une raréfaction des petites vésicules.

Cette ouverture puis cette reformation de petites vésicules semble être le seul changement, visible en microscopie électronique, induit par le NaCl, l'unité structurale de la membrane étant toujours conservée.

- Etude chimique

Nous avons étudié la composition en protéines et en phospholipides des membranes après action du NaCl M. RAY (82) a montré que le NaCl M entraînait le passage dans le surnageant de 33% des protéines membranaires et de 4,2 % des phospholipides. Une partie des protéines membranaires (15 à 20 %) est détachée très facilement de la membrane par du NaCl physiologique (9 ‰) : ce sont probablement des protéines contaminantes solubles (83). Le NaCl M n'enlève, lui, que 10 à 15 % des protéines totales. Plus de 90 % du phosphore organique des membranes appartient aux phospholipides : on peut donc assimiler la teneur en phosphore organique et celle en phospholipides des membranes.

L'action du NaCl M sur les membranes n'entraîne pas de dissociation entre protéines et phospholipides comme le montre l'étude sur gradient de saccharose : on observe une répartition très proche pour les protéines et le phosphore organique entre les trois couches de densité étudiées (tableau XIII), la couche de d = 1,17 (densité normale des membranes) contient la majeure partie des phospholipides et des protéines.

		Répartition entre les couches en %		
		d = 1,15	d = 1,17	d = 1,19
NaCl présent	Protéines	22	60	18
	Phospholipides	25	62	23
Après dialyse	Protéines	30	54	16
	Phospholipides	27	67	8

Tableau XIII : Etude chimique des membranes traitées par le NaCl.

Les membranes traitées sont amenées à une densité de 1,17 par mélange avec une solution de saccharose d = 1,30 et mises en "sandwiches" entre deux couches de d = 1,19 et d = 1,15. Après centrifugation à 38 000 t/minute sur SW 39 pendant 6 heures, on prélève les 3 couches dont on analyse les teneurs en protéines et en phosphore après dialyse du saccharose contre du carbowax.

Spécificité des phospholipases solubilisées par le NaCl

Les membranes étant traitées par du NaCl M, les fractions surnageantes et précipitables sont incubées en présence d'une PE-2-linoléique-1-^{14}C. Nous observons (tableau XIV) une solubilisation quasi totale de la phospholipase A_2 ; cette solubilisation s'accompagne de l'augmentation de l'activité spécifique dans le surnageant d'un facteur 5. Une fraction relativement importante de la phospholipase A_1 se trouve déjà à l'état soluble dans le seul tampon HCO_3^- 1 mM. En présence de NaCl M, la solubilisation de la phospholipase A_1 augmente légèrement mais il reste encore une phospholipase A_1 membranaire assez active.

Pré-incubation		% de Protéine	Activité A_2 %	Activité A_1 %
Témoins $NaHCO_3$ 1mM	S^t	8	11	25
	culot	92	89	75
NaCl 1 M	S^t	30	90	66
	culot	70	10	33

Tableau XIV : Spécificité des phospholipases solubilisées par le NaCl M.

500 µg de protéines membranaires sont suspendues soit dans 0,5 ml de $NaHCO_3$ 1mM, soit dans 0,5 ml de NaCl 1 M pendant 30 minutes puis centrifugées à 12 000 g pendant 10 minutes. Le culot est repris par un volume de $NaHCO_3$ égal au surnageant et les activités phospholipasiques sont dosées sur une aliquote identique du surnageant et de la resuspension membranaire en présence de 16 nmoles de PE-2 linoléique-1-^{14}C.

Etude du détachement de la phospholipase A_2 selon qu'elle est sous forme active ou inactive.

Lorsque les phospholipases membranaires sont à l'état inactif, elles ne sont pas solubilisées par le NaCl M comme le montre l'expérience suivante résumée dans le tableau XV. Les rats ont reçu une injection d'héparine : la phospholipase A_1 est donc complètement détachée des membranes et la phospholipase A_2 est en majeure partie sous forme inactive ; la mise en évidence de l'activité phospholipasique A_2 totale se fait alors en incubant les membranes avec du lysat plaquettaire.

Fractions membranaires	I Mb témoins	II Mb + NaCl M	III Mb activées	IV Mb activées + NaCl M
Matériel sédimentable	20 %	16 %	18 %	1 %
Fraction surnageante	6 %	10 %	7 %	30 %

Tableau XV : Solubilisation de la phospholipase A_2 selon qu'elle est sous forme active ou inactive.

Les membranes suspendues dans du HCO_3^- 1mM à la concentration de 1 mg/ml sont séparées en 4 fractions de 0,5 ml chacune.

Fraction I -

Aux 0,5 ml de suspension membranaire, on ajoute 0,5 ml de HCO_3^- 1mM. On laisse 30 minutes à 20° puis on sédimente à 12 000 t. pendant 10 minutes, Le surnageant prélevé, on resuspend le culot membranaire dans 1 ml de HCO_3^- 1mM et on ajoute à chacune de ces fractions 0,05 ml de lysat plaquettaire. On attend 10 minutes avant de prélever les aliquotes pour doser l'activité phospholipasique.

Fraction II -

Aux 0,5 ml de suspension membranaire, on ajoute 0,5 ml d'une solution de NaCl 2 M puis on traite comme fraction I.

Fraction III -

Aux 0,5 ml de suspension membranaire, on ajoute 0,05 ml de lysat plaquettaire et 0,5 ml de HCO_3^- 1mM. On laisse 10 minutes à 20° puis on sédimente à 12 000 t pendant 10 minutes. Le surnageant étant prélevé et le culot membranaire resuspendu dans 1 ml de HCO_3^- 1mM, on prélève les aliquotes pour le dosage de l'activité phospholipasique.

Fraction IV -

Aux 0,5 ml de suspension membranaire, on ajoute 0,05 ml de lysat plaquettaire. Après 10 minutes, on rajoute 0,5 ml de NaCl M. On laisse 30 minutes à 20° puis on traite comme fraction III.

L'activité phospholipasique est dosée sur des aliquotes équivalentes de chaque fraction surnageante et précipitable. Elle est exprimée en % d'hydrolyse par rapport à la PE de départ.

Le NaCl M entraîne, sur les membranes activées préalablement par le lysat plaquettaire, le passage dans le surnageant de la quasi totalité de l'activité enzymatique (incubation n° IV). Ce départ

n'est pas dû à l'action du lysat plaquettaire car (incubation n° III) il n'entraîne pas de variations des activités enzymatiques des fractions surnageantes et précipitables par rapport aux témoins (incubation n° I). Par contre, si les membranes ne sont pas activées, le NaCl M n'entraîne qu'une très faible augmentation de l'activité enzymatique du surnageant : elle correspondrait peut-être à la mise en solution par le NaCl M de la phospholipase déjà active qui existe dans les membranes de rats héparinés et perfusés.

REFIXATION DES PHOSPHOLIPASES SUR LES MEMBRANES PAR DIALYSE DU NaCl

Si après action du NaCl 1 M et sans séparer les fractions surnageantes et sédimentables on élimine le NaCl par dialyse, il y a refixation de l'activité phospholipasique sur les membranes. Le tableau XVI montre pour différentes concentrations en NaCl la libération de l'enzyme puis sa refixation après dialyse.

NaCl	nmoles de LPG mg de protéines/min.		% d'activité du surnageant	% d'activité retrouvé
	culot	surnageant		
Témoin	2,9			100 %
Témoin dialysé	2,5			84
0,25 M présent	1,1	1,9	19	80
0,25 M dialysé	1,7	1,6	13	75
0,5 M présent	0,34	5,3	68	87
0,5 M dialysé	1,8	3,5	30	68
M présent	0,17	7,6	84	95
M dialysé	2,7	4	35	74

Tableau XVI : Solubilisation et refixation de l'activité phospholipasique.

Les membranes plasmiques préalablement lavées avec du NaCl 0,15 M sont pré-incubées aux concentrations en NaCl indiquées pendant 30

minutes à 4°. Une moitié est dialysée contre du $NaHCO_3$ 1mM à 4° pendant 18 heures, l'autre moitié étant conservée à 4° tout le temps de cette dialyse. Les différentes fractions sont alors centrifugées à froid 10 minutes à 12 000 g.

Sur chacune des fractions surnageantes et sédimentables, on dose les protéines (méthode de LOWRY) et l'activité phospholipasique

RELATIONS ENTRE LES PHOSPHOLIPASES ET CERTAINES PROTEINES MEMBRANAIRES

Relations entre les phospholipases et la leucyl amino peptidase (LAP)

- Action de la papaïne sur les membranes.

Papaïne	% de protéines solubilisées	activité phospholipasique (*)		Activité L.A.P. (**)	
		culot	surnageant	culot	surnageant
Témoin		3		4,7	
1/50	38	2,8	2,6	0,88	9,4
1/200	29	2,8	2,7	1,12	12
1/500	24	2,9	2,7	1,32	15

Tableau XVII

La leucyl β naphtyl amidase est dosée d'après la méthode de GOLDBARG (84). Les membranes plasmiques sont pré-incubées pendant 15 minutes à 37° avec la papaïne aux concentrations indiquées puis centrifugées pendant 30 minutes à 12 000 g.

(*) en n moles de LPG/mg de protéines/minute.
(**) µmoles de β Naphtylamine/mg de protéines/heure.

EMMELOT a montré qu'il existait, dans certaines régions déterminées des membranes plasmiques, des unités globulaires fixées à

la surface (83). Ces globules qui peuvent être détachés par action de la papaïne renferment certains enzymes, tel la leucylamino peptidase. Nous nous sommes demandés s'ils ne contenaient pas aussi les phospholipases. Ceci nous a conduit à comparer l'action de la papaïne sur la leucyl amino peptidase (LAP) et sur les phospholipases (tableau XVII).

L'activité spécifique des phospholipases après traitement à la papaïne est la même dans le surnageant et dans le culot des membranes : sa libération n'est donc pas préférentielle. Au contraire pour la leucyl amidase, l'activité spécifique augmente dans le surnageant et diminue dans le culot membranaire.

Phospholipases et leucyl amidase n'ont donc pas le même comportement vis-à-vis de la papaïne ce qui exclut pour la phospholipase la possibilité d'être contenue dans les mêmes globules que la leucyl amidase.

Relations entre la phospholipase A_2 et les récepteurs de l'insuline et du glucagon

Les membranes étant pré-incubées, soit en présence de lysat plaquettaire, soit en présence de concentrations croissantes d'insuline (0,3 à 5,8 nmoles/mg de protéines membranaires) ou de glucagon (1,4 à 23 nmoles/mg de protéines membranaires), puis de lysat plaquettaire, nous constatons que l'insuline (figure 15) comme le glucagon (figure 16) inhibent la stimulation de la phospholipase A_2 par le facteur plaquettaire. Il y aurait donc proximité topographique entre les récepteurs de ces hormones et le site d'action du facteur plaquettaire.

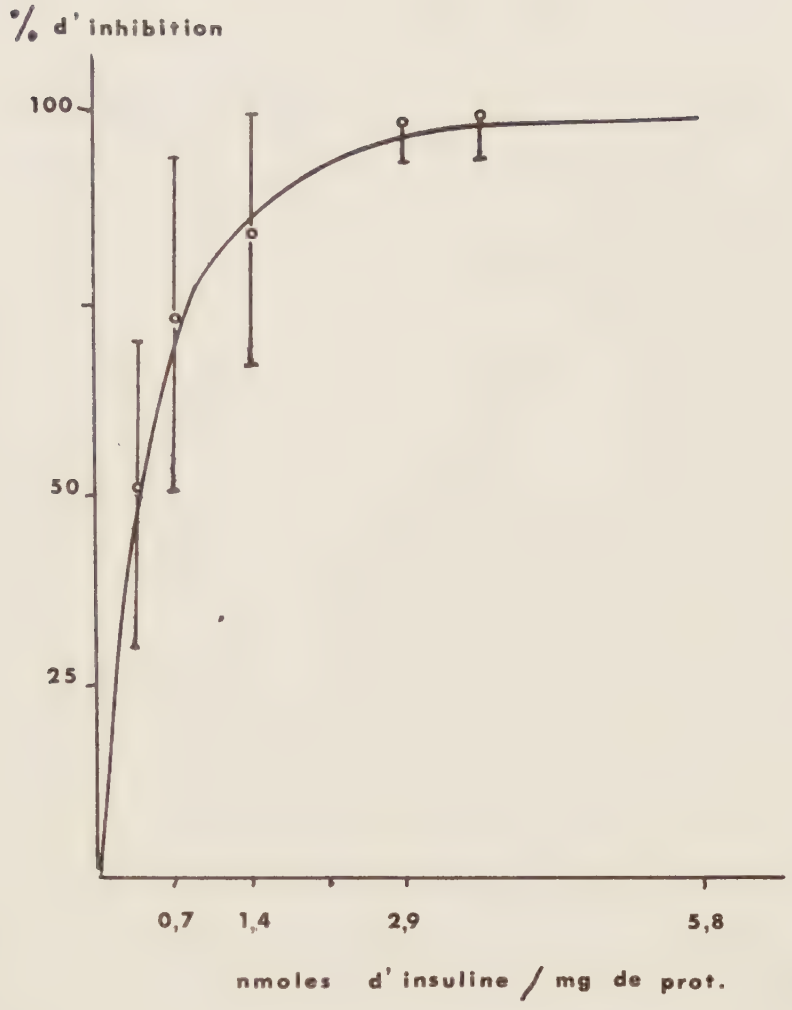


Figure 15 : Inhibition par l'insuline de la stimulation de la phospholipase A_2.

Les membranes sont préparées à partir de rats héparinés dont les foies sont perfusés.

Les pré-incubations contiennent soit 100 µg de protéines membranaires et 5 µl de lysat plaquettaire, soit 100 µg de protéines membranaires, différentes doses d'insuline (100, 200, 400 et 800 Unités) ou de glucagon (5, 10, 20 et 40 µg) et 5 µl de lysat plaquettaire. Les pré-incubations sont de 7 minutes à 37° sous agitation en présence d'insuline ou de glucagon puis de 15 minutes à 20° en présence de lysat plaquettaire.

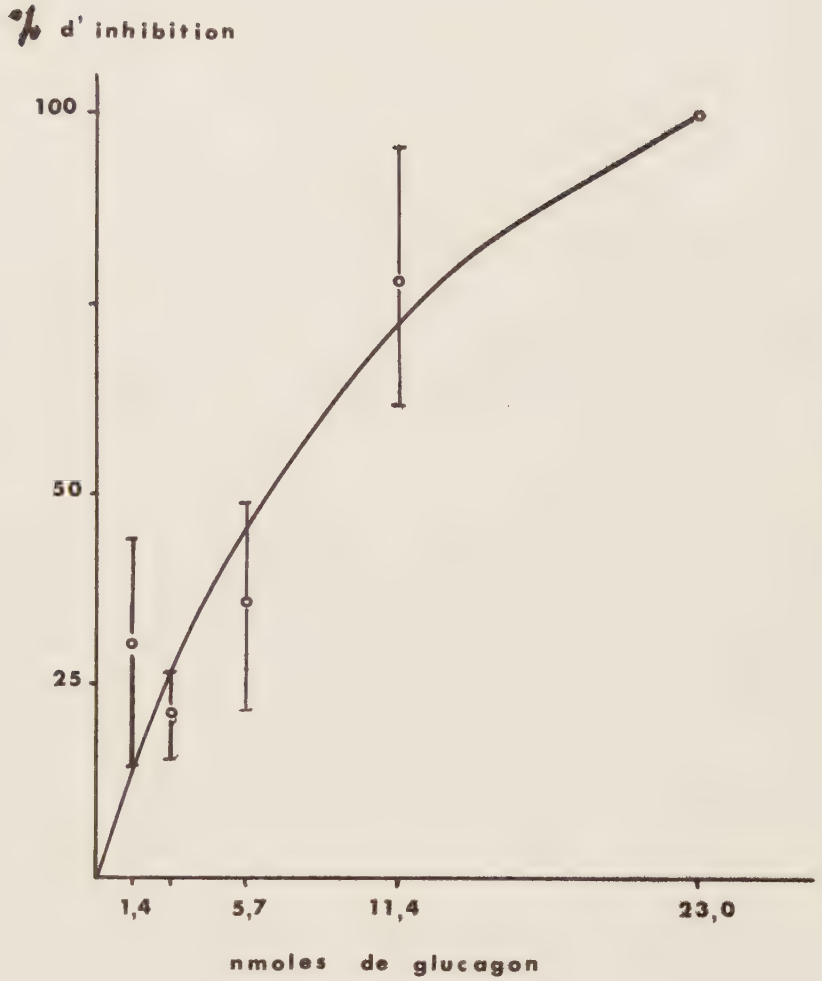


Figure 16 : Inhibition par le glucagon de la stimulation de la phospholipase A_2.

- V -

INCORPORATION D'ACIDES GRAS DANS LES PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES

Les activités phospholipasiques, combinées avec des mécanismes d'acylation, pouvant représenter un moyen de renouvellement des phospholipides membranaires, nous avons recherché si nos préparations membranaires pouvaient incorporer des acides gras dans leurs phospholipides.

Les membranes sont incubées en présence de différents acides gras marqués, de CoA et d'ATP. Dans ces conditions, on observe un marquage de certains phospholipides. Ces incorporations étant très lentes, nous avons dû, pour avoir une activité mesurable, prolonger les temps d'incubation jusqu'à 24 heures : les incubations sont alors faites en présence d'antibiotiques et l'absence de développement bactérien est vérifié en fin d'incubation.

Les membranes plasmiques étant préparées à partir de rats héparinés et perfusés, c'est-à-dire dont les activités phospholipasiques sont très faibles, nous comparons les incorporations d'acides gras saturés et insaturés : elles sont très faibles pour tous les acides gras et tous les phospholipides quoique légèrement plus fortes pour les acides saturés que pour les acides insaturés et ceci dans les trois phospholipides où ces incorporations sont appréciables : la PE, la PC et le PI.

PL membranaires	16:0	18:0	18:1	18:2
PE	0,54	0,17	0,03	0,03
PC	0,21	0,15	0,08	0,17
PI	0,9	0,03	0,07	0,09

Tableau XVIII : Incorporation d'acides gras dans les phospholipides des membranes.

Les acides gras (1-^{14}C palmitique 49mCi/mM ; 1-^{14}C stéarique 30mCi/mM ; 1-^{14}C oléique 32mCi/mM ; 1-^{14}C linoléique 57mCi/mM) sont fixés sur l'albumine par mise en contact de 0,1 ml de leur solution éthérée avec 0,1 ml d'albumine humaine à 3 % dans du sérum physiologique, une nuit à 20°.

Les milieux d'incubation contiennent 1 mg de protéines membranaires, 5 µCid'acide gras radioactif fixé sur l'albumine, de l'ATP 1 mM neutralisé par NaOH, du CoA 0,1 M, pénicilline et streptomycine 50 µg/ml et du tampon Krebs jusqu'à 2 ml. Après 24 heures d'incubation à 37°, les membranes sont lavées à l'albumine délipidée, après extraction les lipides sont déposés sur plaque de silica gel et les phospholipides séparés par migration bidimensionnelle (voir Matériel et méthodes). Les tâches correspondant aux phospholipides marqués sont grattées et comptées en scintillation liquide. Les résultats sont exprimés en nmoles d'acides gras incorporées par mg de protéines et en 24 heures d'incubation.

Les membranes étant toujours préparées à partir de rats héparinés et perfusés, on active la phospholipase A_2 par du lysat plaquettaire. On observe (tableau XIX) une diminution de l'incorporation des acides gras saturés (de 2 à 10 fois selon l'acide gras et le phospholipide) et une augmentation de l'incorporation des acides gras insaturés (de 3 à 8 fois plus).

PL membranaires	16:0	18:0	18:1	18:2
PE	0,16	0,01	0,25	0,32
PC	0,12	0,03	0,57	0,53
PI	0,46	0,01	0,22	0,21
Par rapport à des membranes non activées	↑ 2 à 3 fois	↑ 3 à 10 f.	↑ 3 à 8 f.	↑ 3 à 10 f.

Tableau XIX : Incorporation d'acides gras dans les phospholipides, les membranes étant incubées en présence de lysat plaquettaire.

Comme tableau XVIII, les incubations contenant en outre du $CaCl_2$ 5 mM, du NaCl 0,2 M et 0,1 ml de lysat plaquettaire.

Malgré ces augmentations pour les acides gras insaturés, les incorporations restent très faibles : elles ne pourraient rendre compte que de la reacylation d'environ 1/1000 des lysodérivés formés dans le même temps par les activités phospholipasiques membranaires. De plus elles sont sans rapport avec les espèces moléculaires de phospholipides spécifiques aux membranes. Dans le tableau XX, nous avons rassemblé les résultats de R. WOOD concernant la distribution des acides gras dans les phospholipides de l'homogénat de foie total (6, 8) et des membranes plasmiques (33).

Acides gras		PC		PE		PI	
		Ho	Mb	Ho	Mb	Ho	Mb
16:0	position 1	23	41	25	36	6	13
	position 2	5	9	11	6,5	4	25
18:0	position 1	65	48	65	55	93	68
	position 1	4	5	8	6	5	23
18:1	position 1	7	6	8	1	0,7	14
	position 2	13	14	8	8	4,2	19
18:2	position 1	1	1,5	0	1	0	2
	position 2	22	28	10	15	3,6	10
20:4	position 1	0	0	0	0	0	0
	position 2	39	32	45	44	70	15

Tableau XX : Distribution des acides gras dans les phospholipides des membranes plasmiques selon R. WOOD.

On constate une répartition différente des acides saturés qui estérifient en position 1 la phosphatidyl choline et la phosphatidyl ethanolamine où l'acide palmitique est plus important dans les membranes et l'acide stéarique dans l'homogénat de foie ; différences surtout au niveau du phosphatidyl inositol où la position 2 dans les membranes est estérifiée par une proportion importante d'acides saturés aux dépens de l'acide arachidonique. Or nous n'avons constaté aucune incorporation particulière pouvant rendre compte de cette distribution des acides gras spécifique aux membranes

Vu la faiblesse de ces incorporations et le fait qu'elles sont sans rapport avec la composition en acides gras des phospholipides membranaires, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que ces processus d'estérification soient dûs à la contamination microsomiale de nos préparations membranaires.

DISCUSSION

Ces préparations membranaires sont, par rapport à un homogénat de foie total, enrichies d'environ 20 fois en 5'mononucléotidase, enzyme connu pour être associé aux membranes plasmiques. Tests enzymatiques et microscopie électronique montrent l'absence en quantité significative de mitochondries et de lysosomes. La seule contamination importante de ces préparations est du reticulum endoplasmique mais elle est relativement faible : au maximum de 10 %.

L'examen en microscopie électronique des préparations membranaires montre la présence de larges feuillets parfois réunis par des complexes de jonction ainsi que d'un grand nombre de petites vésicules. EVANS (85) a montré que ces vésicules qui correspondent à une fermeture de villosités qui entourent les canalicules biliaires étaient plus riches en enzymes. L'activité de la 5'mononucléotidase de nos préparations correspond à une valeur intermédiaire entre les activités trouvées pour les pôles biliaires et les pôles vasculaires. Ceci confirme que la préparation contient à la fois deux types de membrane sans qu'on puisse préciser si elle est enrichie en l'une ou l'autre fraction.

Incubées à 37° au pH physiologique en présence de co-facteurs, ces membranes hydrolysent certains phospholipides en lysodérivés. Cette activité phospholipasique nécessite la présence d'ions Ca^{++} de même que l'ensemble des phospholipases hépatiques alcalines, le Ca^{++} inhibant les phospholipases lysosomiales acides (86, 87) elle est fortement activée par le NaCl à faible concentration puis inhibée à forte concentration ; elle présente deux pH optimum, l'un à 7,5 l'autre à 8,5. C'est donc une phospholipase alcaline sensible au Ca^{++}

comme les phospholipases hépatiques microsomiales (49, 50) et mitochondriales (47, 48). Mais nos membranes ne sont pas contaminées par des mitochondries (certainement moins de 1 %) et la comparaison des activités phospholipasiques membranaires et microsomiales, qui ont des activités spécifiques du même ordre de grandeur, montre que 1/10 seulement de l'activité des membranes plasmiques peut s'expliquer par une contamination microsomiale. Cette activité phospholipasique appartient donc bien à la membrane plasmique.

Elle hydrolyse plus rapidement le phosphatidyl glycerol que la phosphatidyl ethanolamine ; elle n'a pas d'action sur la phosphatidyl choline isolée. Son activité est donc sans rapport avec le taux des différents phospholipides dans les membranes plasmiques.

Par marquage des phospholipides endogènes, soit par l'acide oléique ^{14}C, soit par l'éthanolamine 1-2 ^{14}C, nous constatons que dans les conditions d'action des phospholipases membranaires, ces substrats endogènes sont hydrolysés.

C'est en 1970 que nous avons publié l'ensemble des résultats (59) montrant, pour la première fois, la présence d'une activité phospholipasique dans les membranes plasmiques du foie de rat.

Peu de temps après, M. WAITE (76) décrivait la présence dans les membranes plasmiques d'une activité phospholipasique vis-à-vis de substrats exogènes presque uniquement de type A_1 tandis que VICTORIA et coll. (78) mettaient en évidence à la fois sur des phospholipides exogènes et sur des phospholipides endogènes, une activité phospholipasique essentiellement de type A_2. Dans une deuxième publication (79) M. WAITE expliquait que des concentration en Ca^{++} trop faibles lui avaient, jusque là, masqué l'activité membranaire A_2 ; étudiant l'hydrolyse de différents phospholipides, il donnait des valeurs pour les activités A_1 et A_2 très variables suivant le phospholipide.

{^{14}C} PE		{^{14}C} PG		{^{14}C} PC		PS	PI
A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2	PLA	PLA
8,6	3,4	0,47	1,8	0,25	0,19	0,90	0,13

Tableau donné par M. WAITE (79)

Ainsi le rapport des activités A_1/A_2 passe de 2,5 pour la phosphatidyl ethanolamine à 0,25 pour le phosphatidyl glycerol. Mais les concentrations du substrat, dans ce tableau, sont variables d'un phospholipide à l'autre et les activités ne sont pas données en Vmax. Ces résultats sont donc difficilement comparables entre eux mais montrent cependant que l'action est très variable suivant le phospholipide et dans ces conditions, nous avons choisi de poursuivre notre étude des activités phospholipasiques en utilisant toujours le même substrat : la phosphatidyl ethanolamine marquée spécifiquement en position 2.

Nous constatons alors la présence dans les membranes plasmiques des deux activités phospholipasiques A_1 et A_2. L'étude des acides gras libérés par hydrolyse des phospholipides endogènes montre que les deux phospholipases A_1 et A_2 peuvent agir sur les phospholipides membranaires. Ces deux phospholipases ont des cinétiques enzymatiques très différentes ; leurs activités ne varient pas de la même manière en fonction du pH ; il existe une forme inactive de la phospholipase A_2. Leur mode de liaison avec la membrane n'est pas le même puisqu' elles ne sont pas détachées par les mêmes facteurs. Ces différences nous amènent à considérer séparément l'action de ces deux enzymes sur des phospholipides exogènes.

o

o o

La phospholipase A_1 est très sensible aux variations du pH du milieu d'incubation puisque, maximum à pH 8,5-9, son activité est 3 fois moins forte à pH 7,5.

La courbe représentant les variations de l'activité spécifique en fonction de la concentration du substrat croît rapidement pour de faibles concentrations du substrat, puis entre 40 et 60 µM, la vitesse de la réaction diminue ; au delà elle augmente à nouveau. Ce n'est donc pas une hyperbole régulière comme lorsque la réaction enzymatique se fait en milieu homogène. Cette zone de concentration dans laquelle on a une diminution apparente de l'activité enzymatique est typique de substrats tels que les phospholipides qui tendent à former des structures micellaires en milieu aqueux : elle correspond à la zone dans laquelle s'organisent les micelles, c'est-à-dire à la concentration micellaire critique CMC (88). Avec la 1-acyl-2-linoleyl glycerophosphoryl ethanolamine, cette zone critique est située entre 4.10^{-5} et 6.10^{-5} M.

Les dernières années ont vu paraître un certain nombre d'études cinétiques des phospholipides. Elles utilisent toutes des phospholipases solubles, purifiées : soit la phospholipase pancréatique (89, 90), soit des phospholipases de venin (91, 92) et ont été faites sur des substrats synthétiques à courte chaîne solubles dans l'eau (soit dans la zone des formes monomériques). Tout récemment, deux auteurs ont utilisé des concentrations de substrat recouvrant la concentration micellaire critique : WELLS (93) étudie l'hydrolyse de substrats à courte chaîne dont la CMC est de l'ordre de $10.^{-3}$ M et VILJOEN (94) l'hydrolyse de la dipalmitoyl lécithine (CMC = 8.10^{-5} M). Tous deux montrent que leurs activités phospholipasiques (phospholipases isolées de venins de serpent) présentent une phase de transition au niveau de la CMC avec au dessus un effet activateur des formes micellaires du substrat.

La phospholipase A_1 membranaire étudiée se comporte donc comme les phospholipases solubles par l'influence importante du pH et de l'état physique du substrat en solution.

Après injection d'héparine aux rats, les membranes ne possèdent plus d'activité phospholipasique A_1 tandis qu'il y a apparition d'une activité phospholipasique A_1 dans le plasma post héparine(95,96).Plusieurs auteurs (97, 98,99) ont d'ailleurs décrit la libération,par action de l'héparine sur des membranes isolées, de la phospholipase A_1.

Une fraction relativement importante (20 à 25 %) de l'activité phospholipasique A_1 est détachée en même temps que des protéines considérées comme contaminantes (83) par une solution 0,15 M en NaCl. Une force ionique plus grande (NaCl M) en solubilise encore mais d'une façon non spécifique.

Ainsi la phospholipase A_1 peut être assez facilement détachée des membranes ; elle est très sensible aux variations de conditions du milieu (sa sensibilité au pH) ; sa cinétique enzymatique est comparable à celle des phospholipases solubles agissant en milieu hétérogène.

°
° °

La phospholipase A_2 peut exister sous deux formes, active ou inactive : si après injection d'héparine aux animaux, les membranes présentent une activité phospholipasique A_2 très diminuée, il ne s'agit pas d'un détachement comme pour la phospholipase A_1 puisque l'addition d'un lysat de plaquettes de rat aux membranes entraîne la réapparition d'une activité A_2 forte. Les plaquettes de rat contiennent donc un facteur capable d'activer des phospholipases plasmatiques (80) et membranaires (100,81). Le fait que

ce facteur n'agisse qu'après lyse des plaquettes nous permet de penser que l'héparine, préalablement injectée à l'animal, pourrait provoquer cette diminution d'activité phospholipasique A_2 en empêchant une lyse des plaquettes contenues dans le lit vasculaire hépatique lors de la préparation des membranes.

Cependant même après injection d'héparine et perfusion de foies, il reste une activité phospholipasique A_2 de base. Il semble donc qu'une fraction phospholipasique A_2 soit physiologiquement active. Que cette phospholipase A_2 soit activée en cours de préparation par une lyse des plaquettes, qu'il s'agisse de l'activité de base de membranes de rats héparinés et perfusés, ou que ces dernières soient activées par addition ultérieure d'un lysat de plaquettes, l'influence du pH est identique ce qui suggère que dans ces trois cas, l'activité est le fait d'un même enzyme qui ne diffère que par son degré d'activation.

Forme active et forme inactive de la phospholipase A_2 n'ont pas le même mode de liaison avec la membrane, seule la forme active étant détachable lorsque la force ionique du milieu augmente. Cette augmentation de la force ionique n'entraîne pas de modifications structurales de la membrane comme le montre l'examen en microscopie électronique. Par dialyse du NaCl, l'enzyme peut se refixer sur la membrane.

La nature et le mode d'action du facteur plaquettaire sont encore mal connus mais puisque l'activation de la phospholipase A_2 par ce facteur, de même que dans les globules rouges (100), facilite sa solubilisation, cette activation doit consister, soit dans la formation d'une protéine enzymatique plus petite par protéolyse, comme dans le cas de la phospholipase pancréatique (101) soit dans une modification de sa structure tertiaire, dûe à la fixation du facteur plaquettaire, qui rend la protéine plus superficielle et modifie sa liaison avec les autres composants membranaires.

Si nous n'avons trouvé aucune corrélation entre les phospholipases et la leucyl amino peptidase, par contre nous constatons une proximité topographique entre les récepteurs de certaines hormones et le site d'action du facteur plaquettaire puisque la présence d'insuline ou de glucagon empêche la stimulation de l'activité phospholipasique par le facteur plaquettaire.

Le mécanisme d'action de la phospholipase A_2 répond à une cinétique Michaelienne. C'est donc une réaction enzymatique qui se fait en milieu homogène. Nous avons pu ainsi calculer les Vmax et les Km pour les deux substrats étudiés. Avec la phosphatidyl ethanolamine dont l'acide gras en position 2 est l'acide arachidonique, la Vmax est environ deux fois plus faible et l'affinité 10 fois plus grande qu'avec la phosphatidyl ethanolamine dont l'acide gras en position 2 est l'acide linoléique. Pour ces deux substrats, l'affinité est plus importante à pH 7,5 qu'à pH 8,5. VICTORIA (78) étudiant l'activité phospholipasique A_2 à pH 8,0 trouve, avec la PE 2-linoleyl, une Vmax proche de la nôtre mais un Km un peu supérieur : l'affinité de l'enzyme pour le substrat est donc plus faible à pH 8,0 où nous avons constaté une légère diminution d'activité.

Ainsi nous notons pour la phospholipase A_2 l'absence d'influence de la forme physique du substrat sur la vitesse de la réaction enzymatique alors que toutes les études cinétiques sur les phospholipases solubles font état d'une phase de transition au niveau de la CMC. Nous notons aussi de faibles variations en fonction du pH du milieu d'incubation.

o

o o

L'étude de la libération des acides gras dans la membrane plasmique montre qu'au pH optimum 8,5 de l'activité phospholipasique, l'hydrolyse par la phospholipase A_1 des phospholipides endogènes est comprise entre 0,5 et 0,7 nmoles/min./mg de protéines

et l'hydrolyse par la phospholipase A_2 est comprise entre 1,2 et 1,4 nmoles/min./mg de protéines. Or pour ce pH là, quelle que soit la concentration en substrat, l'activité A_1 sur les phospholipides exogènes est toujours supérieure à l'activité A_2. Il y a donc vis-à-vis des phospholipides endogènes, où c'est la phospholipase A_2 qui est plus active, une inversion du rapport de ces deux activités observées sur des substrats exogènes.

D'autre part la présence de PE exogène froide dans le milieu d'incubation diminue l'hydrolyse par la phospholipase A_2 de la PE endogène marquée.

Les différences d'activité de ces phospholipases selon qu'elles agissent sur des substrats endogènes ou exogènes nous ont conduit à envisager des localisationsdifférentes au sein de la membrane pour les sites actifs de ces deux enzymes.

On pourrait envisager que la phospholipase A_1 est située à la surface de la membrane et son site actif tourné vers l'extérieur. son action ne s'exerçant pas dans la membrane mais sur des substrat extérieurs à celle-ci : ceci expliquerait sa cinétique enzymatique comparable à celle de phospholipases solubles, sa sensibilité aux variations de conditions du milieu et qu'elle soit beaucoup plus active sur les phospholipides exogènes que sur les phospholipides endogènes. L'hydrolyse de phospholipides endogènes, faible mais non négligeable, pourrait se produire dans notre hypothèse d'un enzyme à action extra membranaire, lors d'accolement: entre membranes.

Pour la phospholipase A_2, les faibles variations en fonction du pH du milieu d'incubation, l'absence d'influence de la forme physique du substrat sur la vitesse de la réaction enzymatique, son activité plus importante sur les phospholipides endogènes

ces phénomènes pourraient s'expliquer en considérant que le site actif de cette phospholipase A_2 est intra membranaire. Dans ce cas, les phospholipides exogènes ne seraient hydrolysés qu'après pénétration dans la membrane. La diminution d'hydrolyse de la PE endogène en présence de PE exogène serait dûe à la dilution de la PE endogène marquée soit par incorporation de PE exogène froide, soit par échange de cette PE exogène avec les phospholipides membranaires.

Plusieurs auteurs (102,103,104) ont montré que dans la cellule du foie de rat, les phospholipides s'échangent entre le reticulum endoplasmique et les mitochondries. Ces échanges entre mitochondries et microsomes de même qu'entre mitochondries et lipoprotéines plasmatiques (105) sont fortement stimulés par la présence d'un facteur contenu dans le surnageant cellulaire à pH 5,1. Cependant WIRTZ (106) a mis en évidence un échange de phospholipides entre la membrane externe et la membrane interne des mitochondries qui n'est pas stimulé par la présence de fractions protéiques solubles isolées des mitochondries ; il pense qu'une explication possible pour cet échange de phospholipides à l'intérieur de la mitochondrie sans protéine d'échange peut être le fait que membrane externe et membrane interne sont des structures contiguës. Nos préparations membranaires étant débarrassées de tout surnageant cellulaire ne peuvent contenir de protéines d'échange. Mais, comme dans le cas de structures contiguës, les phospholipides exogènes venant au contact de la membrane pourraient pénétrer à l'intérieur par diffusion ou échange entraînant peut-être la sortie de phospholipides endogènes.

De toute façon, que les phospholipides exogènes pénètrent dans la membrane par contact avec celle-ci, ou qu'il s'agisse d'un échange entre phospholipides endogènes et phospholipides exogènes, il est possible que l'hydrolyse des substrats exogènes

que nous observons ne mesure pas la vitesse de l'activité phospholipasique A_2 mais plutôt la vitesse de pénétration des phospholipides exogènes dans la membrane.

o

o o

Parmi les rôles physiologiques possibles de ces phospholipases, nous avons essayé de voir si elles pouvaient intervenir dans un renouvellement des phospholipides ce qui implique que les membranes soient capables d'estérifier les lysodérivés formés. Nos expériences d'incorporation "in vitro" à partir d'acides gras et de CoA montrent que des processus d'estérification existent dans les membranes plasmiques et que l'activation de la phospholipase A_2 augmente l'incorporation des acides gras insaturés. Notons que ces processus d'estérification sont très faibles, environ 1 000 fois plus faibles que l'activité phospholipasique maximale possible. Mais les vitesses d'incorporation varient selon les espèces moléculaires de phospholipides et l'activation par le facteur plaquettaire entraîne des variations d'incorporation qui semblent sans relation avec la vitesse d'hydrolyse de ces phospholipides. On peut remarquer qu'il ne semble pas exister de pool préférentiellement renouvelable puisque l'hydrolyse de phospholipides nouvellement acylés n'est pas plus importante (25 % en 2 heures, voir tableau II) que celle de la phosphatidyl ethanolamine totale (15 % en 15 minutes, voir figure 12).

STAHL et TRAMS (31) ont montré que l'incorporation dans les phospholipides est beaucoup plus importante à partir d'acyl CoA qu'à partir d'acides gras et de CoA ; l'existence d'une acyl C-A synthétase membranaire est néanmoins probable car STEIN (56) a montré que les membranes pouvaient acyler une lysolécithine en présence d'acides gras et de CoA et WRIGHT et GREEN (107) ont montré que l'acide palmitique (^{14}C) était incorporé dans les

phospholipides des membranes plasmiques avant de pénétrer à l'intérieur de l'hépatocyte. Cependant s'il se peut que cet enzyme constitue le facteur limitant de ces incorporations qui ne mesureraient alors que le rôle de cet acyl CoA synthétase dans le cycle d'acylation des phospholipides de la membrane.

Quoi qu'il en soit, si les lysodérivés formés par l'activité phospholipasique sont peut-être reacylés par des acyls CoA préformés ailleurs, les acides gras libérés ne sont pas réutilisés directement pour la synthèse des phospholipides membranaires.

Par ailleurs WAITE (108) a montré que la phospholipase A_1 détachée des membranes par l'héparine peut agir comme une transacylase portant l'acide gras sur des monoglycérides. Il constate en outre que cette phospholipase A_1 est plus active sur les diglycérides que sur les phospholipides et il suggère de l'appeler plutôt monoglycéride acyltransférase. Le rôle de cette phospholipase comme le pense WAITE pourrait être de transacyler les acides gras en position 1 des phospholipides permettant ainsi leur pénétration dans la cellule à travers la membrane plasmique sous forme de diglycérides.

Pour la phospholipase A_2 son rôle est sans doute très différent puisqu'elle agit préférentiellement sur les phospholipides endogènes. On sait que les acides gras polyinsaturés en position 2 des phospholipides membranaires sont les précurseurs des prostaglandines (44). Le fait que la phospholipase A_2 soit activable par un facteur exogène et que l'injection d'insuline ou de glucagon augmente à la fois la synthèse des prostaglandines (109) et l'activité phospholipasique des membranes (110) nous permet d'envisager une régulation possible de la synthèse des prostaglandines par l'intermédiaire de la phospholipase A_2. Cependant en dehors d'une proximité topographique des récepteurs de ces hormones et de la phospholipase A_2, nous n'avons pas trouvé de lien direct entre ces deux types de composés, l'insuline et le glucagon n'activant pas "in vitro" l'activité phospholipasique (111).

Ainsi, phospholipase A_1 et phospholipase A_2 membranaires semblent très différentes, tant par leur mécanisme d'action que par leurs rôles physiologiques.

R E S U M E

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence, en 1970 et pour la première fois dans la membrane plasmique du foie de rat, la présence d'une activité phospholipasique A.

En utilisant des substrats spécifiques, nous constatons la présence de deux phospholipases, l'une de spécificité A_1, l'autre de spécificité A_2 qui hydrolysent tant la phosphatidyl-éthanolamine exogène que la phosphatidyl-éthanolamine endogène. Nous avons étudié les caractéristiques d'action de ces enzymes "in situ" vis-à-vis de substrats exogènes, leur mode de liaison avec la membrane, et montré que la phospholipase A_2 était activable.

La phospholipase A_1 se comporte comme les phospholipases solubles étudiées par différents auteurs : elle présente une diminution d'activité au niveau de la concentration micellaire critique et elle présente un pH optimum d'action étroit vers 8,5-9. D'autre part, elle hydrolyse beaucoup plus les phospholipides exogènes que les phospholipides endogènes et elle est facilement détachable des membranes par l'héparine et par la force ionique. On peut donc penser qu'elle fait partie des protéines superficielles de la membrane et que son site actif est tourné vers l'extérieur.

A l'état actif, la phospholipase A_2 est entièrement solubilisée par la force ionique (NaCl M). Il semble donc qu'elle soit également située en superficie des membranes. Elle peut être refixée par dialyse du NaCl. Cependant sa cinétique d'action vis-à-vis de substrats exogènes n'est pas celle d'un enzyme agissant sur des substrats lipidiques en milieu aqueux puisqu'elle est Michaelienne.

Ces faits, ainsi que l'étude de l'hydrolyse de la phosphatidyl-éthanolamine endogène, en présence de phosphatidyl-éthanolamine exogène, conduisent à penser que l'hydrolyse de substrats exogènes est secondaire à leur pénétration dans la membrane et que le site d'action de cette phospholipase A_2 est orienté vers l'intérieur de la membrane.

Lorsque les membranes sont préparées à partir de foies de rats héparinés, la phospholipase A_2 est à l'état inactif. Dans ces conditions, elle n'est pas détachable des membranes par le NaCl M. Elle est activable "in vitro" par un facteur plaquettaire Il semble que ce facteur soit aussi responsable de l'activation de la phospholipase A_2 lors de la préparation des membranes à partir de rats non héparinés.

Des processus d'estérification à partir d'acides gras libres existent dans les membranes plasmiques mais ils sont très faibles en regard des activités phospholipasiques.

Le rôle de ces phospholipases reste encore obscur. Si pour la phospholipase A_1 on peut envisager un rôle de transfert des acides gras à travers la membrane plasmique, le rôle de la phospholipase A_2 est sans doute très différent : elle pourrait intervenir dans les processus de libération des acides gras poly-insaturés précurseurs des prostaglandines.

B I B L I O G R A P H I E

1. SCANU, A.
In structural and functional aspects of lipoproteins in living systems.
New-York Academic Press, 1969, 425-445.

2. COOK, W.M. and MARTIN, W.G.
Can. J. Biochem. Physiol. 1962, 40, 1273

3. BENSON, A.A.
In membrane models and the formation of biological membranes.
Amsterdam.North Holland Publishig Co, 1968, 190.

4. GREEN, D.E. and TZAGOLOFF, A.
J. Lipid Res. 1966, 7, 587.

5. BROWN, A.D.
J. Mol. Biol. 1965, 12, 491.

6. WOOD, R. ; HARLOW, R.D.
Archiv. Biochem. Biophys. 1969, 131, 495.

7. MONFORT, A. ; VAN GOLDE, L.M.G. ; VAN DEENEN, L.L.M.
Biochem. Biophys. Acta, 1971, 231, 335.

8. WOOD, R. ; HARLOW, R.D.
Archiv. Biochem. Biophys. 1969, 135, 272.

9. O'BRIEN, J.S.
J. Theoret. Biol. 1967, 15, 307.

10. Van DEENEN, L.L.M.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1966, 137, 717.

11. VAN DEENEN, L.L.M. and DE HAAS.
Adv. Lipid. Res. 1964, 2, 167.

12. SJÖSTRAND, F.S.
In structural and functional aspects of lipoproteins in living systems.
New-York. Academic Press. 1969, 73-128.

13. ROBERTSON, J.D.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1966, 137, 421.

14. SINGER, S.J. and NICOLSON, G.L.
Science, 1972, 175, 720.

15. LESTER, R.L. and FLEISCHER, S.
Arch. Biochem. Biophys. 1959, 80, 470.

16. DANDEU, J.P. ; BEREZIAT, G. et BARD.D.
C.R. Acad. Sci. Paris, 1971, 272, 3214.

17. LEVEY, G.S. ; FLETCHER, M.A. ; KLEIN, I. ; RUIZ, E. and SCHENK, A.
J. Biol. Chem. 1974, 249, 2665.

18. TEN-CHING LEE; STEPHENS, N. ; MOEHL, A. and SNYDER, F.
Biochim. Biophys. Acta. 1973, 291, 86.

19. ARIAS, I.M. ; DOYLE, D. and SCHIMKE, R.T.
J. Biol. Chem. 1969, 244, 3303.

20. WIDNELL, C.C. and SIEKEVITZ, P.
J. Cell. Biol. 1967, 35, 142.

21. KIYASU, J.Y. ; PIERINGER, R.A. ; PAULUS, H. and KENNEDY, E.P.
J. Biol. Chem. 1963, 238, 2293.

22. VICTORIA, E.J. ; VAN GOLDE, L.M.G. ; HOSTETLER, K.Y. ; SCHERPHOF, G.L. and VAN DEENEN, L.L.M.
Biochim. Biophys. Acta. 1971. 239, 443.

23. WILGRAM, G.F. and KENNEDY, E.P.
J. Biol. Chem. 1963, 238, 2615.

24. Mc MURRAY, W.C. and DAWSON, R.M.C.
Biochem. J. 1969. 112, 91.

25. WITTZ, K.W.A. and ZILVERSMIT, D.B.
J. Biol. Chem. 1968, 243, 3596.

26. WIRTZ, K.W.A.
17° Congres I.C.B.L. 1974.

27. TACHEUCHI, M. and TERAYAMA, H.
Exp. Cell. Res. 1965, 40, 32.

28. SKIPSKY, V.P. ; BARCLAY, M. ; ARCHIBALD, F.H. ; TEREBUS-KERISH, O. ; REICHMAN, E.S. and GOOD, J.J.
Life Sci. 1965, 4, 1673.

29. DOD, B.J. and GRAY, G.M.
Biochim. Biophys. Acta. 1968, 150, 397.

30. PFLEGER, R.C. ; ANDERSON, N.G. and SNYDER, F.
Biochemestry 1968, 7, 2826.

31. STAHL, W.L. and TRAMS, E.G.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 163, 459.

32. RAY, T.K., SKIPSKY, V.P. ; BARCLAY, M. ; ESSNER, E. and ARCHIBALD, F.M.
J. Biol. Chem. 1969, 244, 5528.

33. WOOD, R.
Arch. Biochem. Biophys. 1970, 141, 174.

34. AKESSON, B. ; ELOVSON, J. ; ARVIDSON, G.
Biochem. Biophys. Acta, 1970, 210, 15.

35. VAN DEN BOSCH, H. ; VAGELOS, P.R.
Biochem. Biophys. Acta. 1970, 218, 233.

36. ARVIDSON, G.A.E.
Eur. J. Biochem. 1968. 4, 478.

37. HILL, E.E. ; HUSBANDS, D.R. ; LANDS, W.E.M.
J. Biol. Chem. 1968, 243, 4440.

38. PASCAUD, M.
Biochim. Biophys. Acta. 1964, 84, 528.

39. LANDS, W.E.M.
J. Biol. Chem. 1960, 235, 2233.

40. SCHERPHOF, G.L. ; VAN DEENEN, L.L.M.
Biochim. Biophys. Acta, 1966, 113, 417.

41. RESCH, K. ; FERBER, E.
Eur. J. Biochem. 1972, 27, 153.

42. FISCHER, H.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1964, 116, 1063.

43. CAVARD, D. ; RAMPINI, C. ; BARBU, E. et POLONOVSKI, J.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1968, 50, 1455.

44. NUGTEREN, D.H. ; BERTHUIS, R.K. and VAN DORP, D.A.
Nobel Symposium 2, Prostaglandins. Ed. BERGSTROM S. and SAMUELSON, B. Almquist and Wiksell. Stockholm. 1967. 45-50.

45. NEVILLE, D.M.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 1960, 8, 413.

46. ANDERSON, N.G. ; LANSING, A.I. ; LIEBERMAN, I., RANKIN, C.T. and ELROD, H.
Wistar Inst. Symp. Monog. 1968, 8, 23.

47. SCHERPHOF, G.L. and VAN DEENEN, L.L.M.
Biochim. Biophys. Acta, 1965, 98, 204.

48. ROSSI, C.R. ; SARTORELLI, L. ; TATO, L. ; BARETTA, L. and SILIPRANDI, N.
Biochim. Biophys. Acta. 1965, 98, 207.

49. SCHERPHOF, G.L. ; WAITE, M. and VAN DEENEN, L.L.M.
Biochim. Biophys. Acta. 1966, 125, 406.

50. BJORNSTAD, P.J.
Biochim. Biophys. Acta, 1966, 16, 500.

51. LANDS, W.E.M.
J. Biol. Chem. 1960, 235, 2233.

52. STOFFEL, W. and SCHIEFER, H.G.
Z. Physiol. Chem. 1968, 349, 1017.

53. SARZALA, M.G. ; VAN GOLDE, L.M.G. ; DE KRUYFF, B. and VAN DEENEN, L.L.M.
Biochim. Biophys. Acta. 1970. 202, 106.

54. STAHL, W.L. and TRAMS, E.G.
Biochim. Biophys. Acta. 1968. 163, 459.

55. PANDE, S.V. and MEADS, J.F.
J. Biol. Chem. 1968, 243, 352.

56. STEIN, Y. ; WIDNELL, C. and STEIN, O.
J. Cell. Biol. 1968, 39, 185.

57. EIBL, H. ; HILL, E.E. and LANDS, W.E.M.
European? J. Biochem. 1969, 9, 250.

58. KAULEN, H.D. ; HENNING, R. and STOFFEL, W.
Z. Physiol. Chem. 1970, 351, 1555.

59. TORQUEBIAU, O-COLARD ; PAYSANT, M. ; WALD, R. et POLONOVSK , J.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1970, 52, 1061.

60. EMMELOT, P. ; BOS, C.J. ; BENEDETTI, E.L. and RUMKE, P.H.
Biochim. Biophys. Acta. 1964, 90, 126.

61. MARINETTI, G.V. and GRAY, G.M.
Biochim. Biophys. Acta. 1967. 135. 580.

62. GRAHAM, J.M. ; KIGGINS, J.A. ; GREEN, C.
Biochim. Biophys. Acta. 1968, 150, 303.

63. RAY, T.
Biochim. Biophys. Acta, 1970, 196, 1.

64. LOWRY, O.H. ; ROSEBROUGH, N.J. ; FARR, A.L. and RANDALL, R.J.
J. Biol. Chem. 1951, 193, 265.

65. DELSAL, J.L. et MANHOURI, M.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1955, 37, 1041.

66. DUTTERA, S.M. ; BYRNE, W.L. et GANOZA.
Biochem. J. 1955, 59, 433.

67. APPELMANS, F. ; WATTIAUX, R. et DE DUVE, C.
Biochem. J. 1955, 59, 438.

68. DIXON, Th. F. et PURDOM, M.
J. Clin. Path. 1954, 7, 341.

69. FISKE, C.H. and SUBBAROW, Y.
J. Biol. Chem. 1925, 66, 375.

70. FOLCH, J. ; LEES, M. and SLOANE-STANLEY, G.H.
J. Biol. Chem. 1957, 226, 497.

71. Waite, M. and VAN DEENEN, L.L.M.
Biochim. Biophys. Acta, 1967; 137. 498.

72. LONG, C. and PENNY, I.F.
Biochem. J. 1957, 65, 382.

73. MARINETTI, G.V.
Biochim. Biophys. Acta. 1964, 84, 55.

74. DUCHESNE, M.J. ; ETIENNE, J. ; GRUBER, A. et POLONOVSKI, J.
Biochimie. 1972, 54, 257.

74(a). DOD, B.J. and GRAY, G.M.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 150, 397.

75. SHOHET, S.B.
J. of clinical investigation. 1970, 49, 1669.

76. NEWKIRK, J.D. and WAITE, M.
Biochim. Biophys. Acta. 1971. 225, 224.

77. NACHBAUER, J. ; COLBEAU, A. and VIGNAIS, P.M.
Biochim. Biophys. Acta 1972, 274, 426.

78. VICTORIA, E.J. ; VAN GOLDE, L.M.G. ; HOSTETLER, K.Y. ;
SCHERPHOF, G.L. and VAN DEENEN, L.L.M.
Biochim. Biophys. Acta 1971, 239, 443.

79. NEWKIRK, J.D. and WAITE, M.
Biochim. Biophys. Acta 1973, 298, 562.

80. TORQUEBIAU-COLARD, O. ; ETIENNE, J. et POLONOVSKI, J.
CR. Acad. Sc. Paris. 1972. 275, 2775.

81. DUCHESNE, M.J. ; ETIENNE, J. ; GRUBER, A. et POLONOVSKI, J.
Biochimie, 1972, 54, 257.

82. TUSCHAR, K.R. ; JYOTIROMOY, D. et MARINETTI, G.V.
Chem. Phys. Lipids. 1972. 9, 35.

83. EMMELOT, P. ; VISSER, A. et BENEDETTI, E.L.
Biochim. Biophys. Acta. 1968, 150, 366.

84. GOLDBARG, J.A. and RUTENBERG, A.M.
Cancer. 1958, 11, 283.

85. EVANS, W.H.
FEBS Lett. 1969, 3, 237.

86. BJÖRNSTAD, P.J.
Biochim. Biophys. Acta. 1966, 116, 836.

87. STOFFEL, W. and TRABERT, U.
Z. Physiol. Chem. 1969, 350, 836.

88. GATT, S. and YECHEZKEL, B.
Annue. Rev. Biochem. 1972, 42, 129.

89. DE HAAS, G.H. ; BONSEN, P.P.M. ; PIETERSON, W.A. and VAN DEENEN, L.L.M.
Biochim. Biophys. Acta 1971, 239, 252.

90. BONSEN, P.P.M. ; DE HAAS, G.H. ; PIETERSON, W.A. and VAN DEENEN, L.L.M.
BIOCHIM. Biophys. Acta. 1972, 270, 364.

91. WELLS, M.
Biochemestry. 1972, 11, 1030.

92. ROHOLT, O.A. and SCHLAMOWITZ, M.
Arch. Biochem. Biophys. 1961, 94, 364.

93. WELLS, M.
Biochemestry. 1974. 13, 2248.

94. VILJOEN, C.C. ; SCHABORT, J.C. and BOTES, D.P.
Biochim. Biophys. Acta. 1974. 360, 156.

95. VOGEL, W.C. and ZIEVE, L.
J. Lipid. Res. 1964, 5, 177.

96. INFANTE, R. ; POLONOVSKI, J. and DONON, O.
Biochim. Biophys. Acta 1967. 144, 490.

97. ZIEVE, F.J. and ZIEVE, L.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972, 47, 1480.

98. ASSMAN, G. ; KRAUS, R.M. ; FREDRICKSON, D.S. ; LEVY, R.I.
J. Biol. Chem. 1973, 248, 1992.

99. WAITE, M. and SISSON, P.
J. Biol. Chem. 1973, 248, 7201.

100. ETIENNE, J. ; GRUBER, A. et POLONOVSKI, J.
Paroi artérielle. 1973, 1, 119.

101. DE HAAS, G.H. ; POSTEMA, N.M. ; NIEUWENHUISEN, W. and VAN DEENEN, L.L.M.
Biochim. Biophys. Acta. 1968, 159, 118.

102. WIRTZ, K.W.A. and ZILVERSMIT, D.B.
Biochim. Biophys. Acta. 1969, 187, 468.

103. JUNGALWALA, F.B. and DAWSON, R.M.C.
Biochem. J. 1970, 117, 481.

104. STEIN, O. and STEIN, Y.
J. Cell. Biol. 1969, 40, 461.

105. WIRTZ, K.W.A. and ZILVERSMIT, D.B.
Biochim. Biophys. Acta. 1969, 193, 105.

106. BLOK, M.C. ; WIRTZ, K.W.A. and SCHERPHOF; G.L.
Biochim. Biophys. Acta. 1971. 233. 61

107. WRIGHT, J.D. and GREEN, C.
Biochem. J. 1971. 123, 837.

108. WAITE, M. and SISSON, P.
J. Biol. Chem. 1973. 248, 7985.

109. BEREZIAT, G. ; BARD, D. et POLONOVSKI, J.
sous presse. C.R. Soc. Biologie.

110. BEREZIAT, G. ; COLARD, O. et BARD, D.
17° Congres. I.C.B.L. Septembre 1974.

111. BEREZIAT, G. ; COLARD, O.;BARD, D. et POLONOVSKI, J.
sous presse. C.R. Soc. Biologie.